生物力能学

化学渗透理论介绍

〔英〕 D. G. 尼柯尔斯 著

11

科学出版社

中科院植物所图书馆
S0011805

58.17/11
166

生物力能学

化学渗透理论介绍

〔英〕D. G. 尼柯尔斯 著
张玉中 阎一林 译
杨福愉 校

中国科学院
图书馆藏
生物研究所

科学出版社
1987

25708

内 容 简 介

生物力能学已成为当今生物化学领域中的一门重要学科。本书详尽地介绍了这一学科的基本内容和主要研究成果，并对所涉及的物理化学定理做了细致的解释与推导。书中叙述深入浅出，条理性强，并辅以大量形象的图解，从而将生物力能学庞杂的知识归纳整理得清楚有序。它不仅适宜理科院校生物系师生及医学院师生阅读，也可供从事有关研究的科学工作者参阅，是近年来关于生物力能学的一本比较系统的专著。

David G. Nicholls

BIOENERGETICS

An Introduction to the Chemiosmotic Theory

Academic Press 1982

生 物 力 能 学

化学渗透理论介绍

〔英〕D. G. 尼柯尔斯 著

张玉中 阎一林 译

杨福愉 校

责任编辑 吴铁双

科 学 出 版 社 出版

北京朝阳门内大街 137 号

中国科学院印刷厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

•

1987年 8 月第 一 版 开本：787×1092 1/32

1987年 8 月第一次印刷 印张： 6 1/2

印数：0001—3,000 字数：141,000

统一书号：13031·3623

本社书号：4921·13-10

定价：1.55 元

前　言

近三十年来，生物力能学已经成为生物化学领域中一个独特的学科。这个以 Peter Mitchell 化学渗透假说为主干的学科虽然已被阐述得极为详尽，但是对于大学生或一般生物化学工作者来说，要领会生物力能学研究论文仍是困难的。这个问题在很大程度上是由于一般生物化学教科书与研究论文之间相互脱节而造成的：教科书因压缩篇幅对这一课题只能略加描述，而研究论文趋于高度专业性，且通常是有争议的，有时则含糊不清。

本书打算对这一领域进行介绍而不是全面地综述。由于几乎每个所要涉及的论题上都存在着不同的见解，因此，第一，我只能按生物力能学中那些我觉得流行的正统观念来写，特别要以化学渗透假说的"中心法则"——能量转换基于质子电化学梯度这一论点作为出发点来写。其次，我高度选择性地使用参考文献，为了便于说明，只引证易于理解的综述及有限的原始论文。通过那些综述文章读者可以接触到全部生物力能学文献书目，使得本书可以大为精简。我希望同行们会认识到这样选择原始文献并不反映科学进程。

我所用的一般生物化学知识相当于目前普通生物化学教科书的水平，故本书的对象是四年级大学生、研究生及一般研究工作者。

感谢 Abraham Tulp和TAB的漫画。第2、4、5、6、7章前面的漫画是经《生物化学动态》(*Trends in Biochemical Sciences*) 杂志允许而复制的。

D. G. 尼柯尔斯

1981年9月　邓迪

前 言

近三十年来，生物力学已经成为生物科学领域中一个新的学科。这个词是 Fulton Mitchell 在学术报告中提出来的，他认为这个学科应称为生物化学工作者参加，要使生物力学成为一个真正的科学，这个问题在很大程度上是由于一部生物化学家，并引起了对这个问题的注意力的结果。然而，在这个学科中，对于一部生物化学家，而所需的文献与有关的专业书，可能常常会感到困难。

本书的编写，是为了满足这个需要的。

本书的编写，是为了满足这个需要的。

我们的编写，是为了满足这个需要的。

我们的编写，是为了满足这个需要的。

我们

目　录

1　化学渗透能量转换……（2）
1.1　什么是“能量转换”？……（2）
1.2　化学渗透假说……（4）
1.3　能量转换细胞器……（7）
1.4　化学渗透假说的背景……（15）

2　跨越能量转换膜的离子运输……（27）
2.1　引言……（27）
2.2　能量转换膜的结构……（27）
2.3　离子运输的途径……（28）
2.4　双分子层区域的自然通透性……（32）
2.5　双分子层区的离子载体导致的通透性……（32）
2.6　蛋白质催化的运输作用……（38）
2.7　大量溶质跨越能量转换膜的运动……（39）

3　定量生物力能学：驱动力的测量……（45）
3.1　引言……（45）
3.2　Gibbs 能量……（48）
3.3　氧化还原电位……（53）
3.4　离子电化学电位差……（58）
3.5　离子、弱酸与弱碱的均衡分布……（60）
3.6　膜电位、扩散电位、Donnan
电位及表面电位……（63）

3.7 光子…… (65)
3.8 生物能量的互相转化…… (65)
3.9 不可逆热力学的应用…… (67)

4 化学渗透质子回路…… (70)
4.1 引言…… (70)
4.2 质子电化学电位的测量…… (72)
4.3 呼吸链质子排出的化学定量计算…… (83)
4.4 ATP合成酶质子吸收的化学计量…… (88)
4.5 质子流、质子传导性及呼吸控制…… (90)
4.6 能量转换作用的非化学渗透参数…… (98)
4.7 反向电子传递和由水解作用驱动的质子回路…… (100)
4.8 由人工质子电化学电位所驱动的ATP合成 (102)

5 呼吸链…… (105)
5.1 引言…… (105)
5.2 线粒体呼吸链的组分及研究方法…… (105)
5.3 呼吸链中氧化还原载体的线性顺序…… (114)
5.4 通过呼吸链的质子移位作用；由"回路"模型或"构象泵"模型而来的结构预测…… (120)
5.5 呼吸链复合体的分离与重组…… (123)
5.6 复合体Ⅰ(NADH-UQ氧化还原酶)…… (124)
5.7 复合体Ⅱ(琥珀酸脱氢酶)；电子传递黄素蛋白以及α-甘油磷酸脱氢酶…… (125)
5.8 泛醌与复合体Ⅲ(bc_1-复合体或UQ-细胞色素c氧化还原酶)…… (126)
5.9 细胞色素c与复合体Ⅳ(细胞色素c氧化

酶；亚铁细胞色素；O_2 氧化还原酶）…… (130)
5.10 烟酰胺核苷酸转氢酶…… (133)
5.11 植物线粒体的呼吸链…… (134)
5.12 细菌的呼吸链…… (136)

6 质子电化学电位的光合发生器…… (141)
6.1 引言…… (141)
6.2 紫色菌的光反应…… (143)
6.3 紫色菌中 $\Delta\tilde{\mu}_{H+}$ 的产生 …… (146)
6.4 叶绿体中的电子传递途径…… (151)
6.5 叶绿体中的质子回路…… (155)
6.6 细菌视紫红质与嗜盐菌的紫色膜…… (156)

7 ATP合成酶 …… (161)
7x.1 引 言…… (161)
7.2 ATP合成酶的结构…… (161)
7.3 F_0的功能…… (164)
7.4 通过F_1的ATP 合成的机制…… (166)
7.5 腺苷酸与Pi在线粒体中的运输…… (170)

8 生物能细胞器与其环境间的相互作用…… (177)
8.1 引言…… (177)
8.2 代谢物运输的研究方法…… (177)
8.3 线粒体的代谢物载体…… (179)
8.4 线粒体中的钙运输…… (182)
8.5 细菌中的运输…… (186)
参考文献…… (189)

常用符号缩写表

Ac	醋酸盐
AcAc	乙酰醋酸盐
ADP/O	当2个电子由底物经过呼吸链传递将1个"O"($\frac{1}{2}O_2$)还原成H_2O时(无单位)(第4.6节),被磷酸化为ATP的ADP的分子数
ADP/2e⁻	除了较普遍地表示为最终电子受体而不可能是"O"外,表示为ADP/O(无单位)(第4.6节)
Bchl	细菌叶绿素
Bpheo	细菌脱镁叶绿素
CF_1	见F_1
C-表面	与细胞液*接触的线粒体内膜的表面(参见M-表面)
Chl	叶绿素
C_MH^{-1}	膜或一个膜组分的有效质子传导性(单位:n mol $H^+\cdot min^{-1}\cdot$mg蛋白$^{-1}\cdot$mV质子电化学电位$^{-1}$)(第4.5节)
DNP	二硝基苯酚(质子移位体)
DCCD	双环己基碳化二亚胺
dO/dt	呼吸率(单位:n mol $O\cdot min^{-1}$ mg蛋白$^{-1}$)
E	pH=0时的氧化还原电位(单位:mV)(第3.3节)
E_0	pH=0时的标准氧化还原电位(单位:mV)(第3.3节)

* 应为与膜间间隙接触的表面,更为确切。——译者

E_h 在特定pH下的实际氧化还原电位（单位：mV）（第3.3节）

E_m 中点电位（在特定pH下的标准氧化还原电位）（单位：mV）（第3.3节）

$E_{h,7}$ pH＝7时的实际氧化还原电位

$E_{m,7}$ pH＝7时的中点电位

ETP, etp 电子传递颗粒（亚线粒体颗粒）（第1.3节）

F 法拉第常数（＝0.0965kJ mol^{-1} mV^{-1}）；在由mV变换为kJ $mole^{-1}$时，乘上"F"（第3.3节）

FCCP 羰基：氰化-对-三氟甲氧基苯腙，质子移位体

Fe/S中心 一种含有酸不稳定非血红素铁的氧化还原蛋白质的辅基（第5.2节）

F_0 ATP合成酶的一个部分（第7.3节）

F_1, CF_1, TF_1 分别为线粒体、叶绿体及耐热菌的ATP合成酶的催化部分（第7.3节）

G Gibbs能量值（第3.2节）

H 焓值

H^+/ATP 为合成一个分子的ATP而流经ATP合成酶的质子数（无单位）（第4.4节）

H^+/O 在$2e^-$由底物迁移到氧的过程中被呼吸链所移位的质子数目（元单位）（第4.3节）

$H^+/2e^-$ 除了较普遍地表示为需要的非氧最终电子受体外，表示为H^+/O

$h\nu$ 一个光子所具有的能量（单位：kJ）（第3.7节）

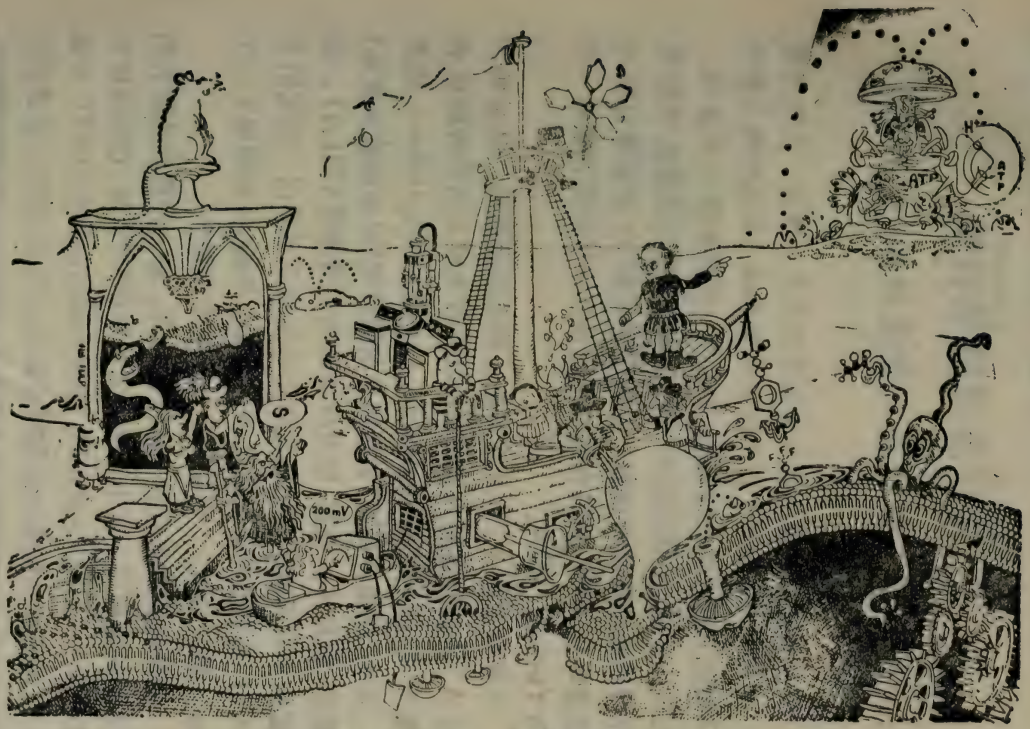
J_{h^+} 质子流（单位：n mol H^+min^{-1} mg蛋白$^{-1}$）（第4.5节）

K 绝对平衡常数（第3.2节）

K' 表观平衡常数（第3.2节）

kD	千道尔顿,1000分子量单位
kJ	千焦耳
M-表面	线粒体内膜与基质接触的表面
NEM	N-乙基马来酰亚胺
O	$\frac{1}{2}O_2$
OSCP	寡霉素敏感性授予蛋白(第7.2节)
PC	质体花青(第6.4节)
PEP	磷酸烯醇式丙酮酸
Pi	正磷酸
PMS	吩嗪硫酸甲酯
PQ	质体醌
P/O	如同ADP/O
$P/2e^-$	如同$ADP/2e^-$
PS_I,PS_{II}	叶绿体光合系统(反应中心)Ⅰ和Ⅱ(第6.4节)
P_{870} etc	反应中心的初级光化学组分
q^+/O	当$2e^-$通过呼吸链由底物传递给氧时,跨膜传导的电荷数目(第4.3节)
$q^+/2e^-$	如同q^+/O,但更普遍表示为所需的不是氧的最后电子受体
R	气体常数(=0.0083kJ mol^{-1} K^{-1})
RC	反应中心(第6.1节)
SMP	亚线粒体颗粒
S	熵
T	按开氏度(K°)的绝对温度
TMPD	四甲基对苯二胺,氧化还原中间物(第5.9节)
UQ,UQH,UQH_2,UQ_2,UQ_8,UQ_{10}	氧化型的、半醌及还原型的泛醌;写在Q下角的是侧链中异戊间二烯基的数目

Γ, Γ'	绝对质量作用率和表观质量作用率(第3.2节)
ΔE_h	在限定pH之下两个电偶之间的实际氧化还原电位差(单位：mV)(第3.3节)
$\Delta E_{h,7}$	如同ΔE_h,但是指pH=7(第3.3节)
ΔG	Gibbs能量变化(单位kJ mol^{-1})(第3.2节)
ΔG°	基于绝对平衡常数的标准Gibbs能量变化(第3.3节)
$\Delta G^{\circ\prime}$	基于表观平衡常数的标准Gibbs能量变化;pH等必须是特定的(第3.3节)
ΔG_p	"磷酸化势能"即由ADP和pi合成ATP的Gibbs能量变化(第3.3节)
ΔH	焓的变化
ΔPH	膜两侧的总相bulk phase之间的pH之差(无单位)
ΔS	熵的变化
$\Delta\bar{\mu}x^{m+}$	被膜分开的两个总相之间的离子X^{m+}电化学电位差(第3.4节)
$\Delta\bar{\mu}_H$,	被膜分开的两个总相之间的质子电化学电位差(单位：mV)(第3.4节);有时被称为质子运动力(pmf)
$\Delta\psi$	膜电位,即由膜分开的两个总相之间的电位差(单位：mV)(第3.4节)
"～"	"squiggle"：化学假说中表示假设的能量传导中间物的速记符号



Mitchell 不顾航程危险的警告，启航驶向化学渗透新世界

1 化学渗透能量转换

1.1 什么是“能量转换”？

所有生物化学反应都包含能量的变化，所以“生物力能学”这个词可以适用于整个生物化学学科。但是生物力能学家只倾向于研究那些特殊的、发生在一类特定膜上的过程。过去三十年中，生物力能学的中心课题是研究通过底物的氧化作用或光的吸收作用而产生能量的机制，这种能量可用来驱动诸如从ADP及Pi合成ATP，或者离子跨膜积聚这一类上向（uphill）反应。

尽管有某些ATP是在可溶性酶系中合成的，但是绝大部分ATP的合成则与被限制在特定种类膜上的那些膜结合酶复合体（membrane-bound enzyme complexes）相关联。这类“能量转换膜”包括简单的原核细胞（如细菌或蓝藻）的质膜，线粒体的内膜，以及叶绿体的类囊体膜（图1.1）。虽然这些不同的膜的最初能量来源的性质互不相同，但它们合成ATP及运输离子的机制却是紧密相关的，从而形成了一个单独的研究领域：“能量转换”或“生物力能学”。

能量转换膜具有若干独特的性质。每一种膜都装配有两套不同的蛋白质。其中一套通常被称作ATP酶，它能够催化ADP和Pi“上向”合成ATP，若更准确些应称它为ATP合成酶，这对所有的能量转换膜来说都是共同的。而第二套蛋白质的性质则依膜的最初能量来源而定；在线粒体或呼吸细菌中，它们是能够催化电子从底物向最终受体O_2“下向”（downh-

ill)传递的呼吸链。在叶绿体及光合细菌中，这套蛋白质则利用吸收可见光光子来得到能量(图1.1)。

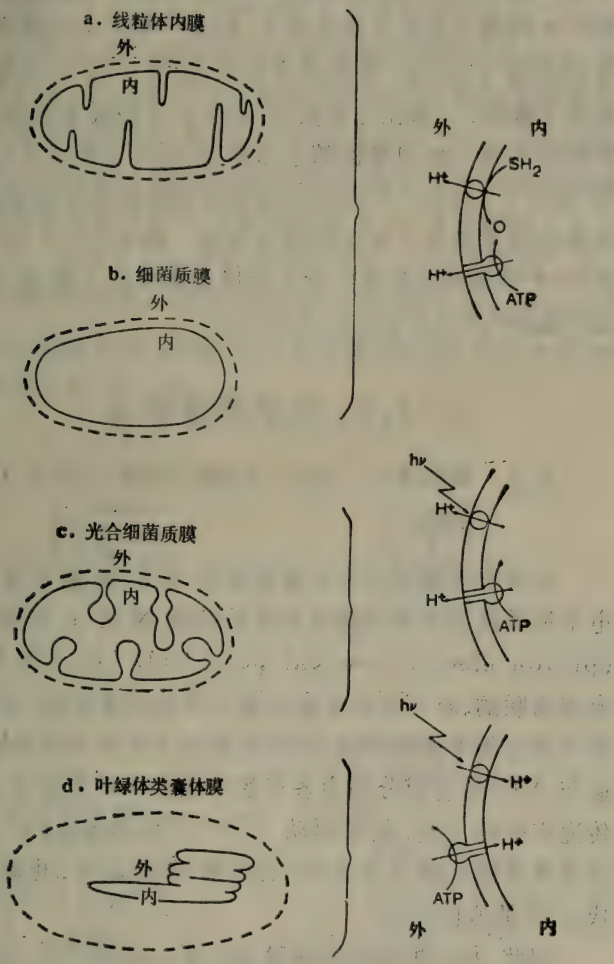


图1.1 能量转换膜

与这套蛋白质装置相关联的"能量转换中间物"的性质很令人难以捉摸。多年来对于能使氧化作用与ATP合成作用相

偶联的化学中间物的研究一无所获，以致它的不确定性引起了这样的说法："人们不是被完全搞糊涂了，而是没有真正理解这个问题"。正是在这个关头，Peter Mitchell提出了"化学渗透假说"(1961)。在假说中他认为，唯一的"中间物"乃是跨膜质子梯度。一场在化学假说、化学渗透假说及其他种种假说的拥护者间的激烈辩论随之而起，长达十五年之久(见Boyer等，1977)。因此，与其他任何相应的生物化学理论相比，化学渗透假说经历了更为严峻的考验。随着Peter Mitchell荣获1978年诺贝尔奖金，这个假说最终得到了普遍承认(见Garland，1978；Chappell，1979)。

1.2 化学渗透假说

综述 Mitchell, 1961; 1966; 1968, 1979a; Greville, 1969

化学渗透假说的中心法则指出，线粒体、叶绿体或细菌的电子传递链都是通过跨越能量转换膜的质子电化学电位(proton electrochemical potential, $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$)与ATP的合成相偶联的。质子电化学电位是一种热力学单位，它表示跨膜质子梯度与平衡态的差，这将在第3.4节中予以推导。电子传递与ATP的合成分别由各自的可逆质子泵来催动。通过电子传递产生的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$用来驱动ATP-水解质子泵(即ATP酶，或者更准确地称之为ATP合成酶)反向运行，也就是朝着合成ATP的方向运行。

因此，每一种能量转换膜都具有两类质子泵，一类是通过电子转移或捕获光子来驱动，而另一类则是通过水解ATP来驱动(正向运转)(图1.1)。这两类泵的方向相同，即电子沿电子传递链的"下向"传递与ATP合成酶的"下向"水解ATP，都

会使质子按照相同的方向跨膜移位(图1.1)。

图1.2解释了这些泵如何被用来不断地合成ATP。假若安排特定的条件,只让ATP合成酶具有活性并将ATP加入到细胞器中,那么,这个核苷酸就会被水解并有质子被泵出,直至进一步水解ATP所产生的能量与逆着已有的质子梯度进一步泵入质子所需的能量达到平衡为止(图1.2b)。如果这种平衡状态由于去除ATP而被破坏的话,那么ATP合成酶就会在质子梯度的驱动下反转过来并沿着ATP净合成的方向运行(图1.2c)。然而质子梯度消失得很迅速,所以需要第二类质子泵来不断地维持这一梯度。在体内,ATP不断地被细胞液内的各种反应所消耗,同时$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$则始终由呼吸(或光合成)电子传递链来补充(图1.2d)。

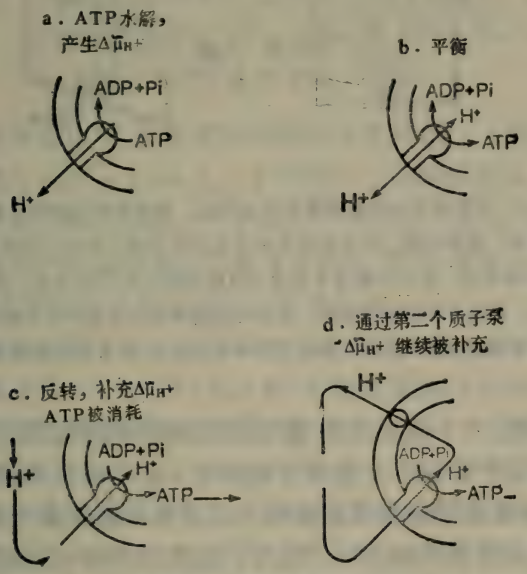


图1.2 质子电化学偶联

这种质子移位的综合作用建立了跨越能量转换膜的质子

循环(图1.3),它与电路十分相似,并且在详尽地讨论复杂的能量流动(energy flows)时这种相似性仍然适用(见第4章)。如同在电子学中一样,我们可以测量势能(质子电化学势,$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$,前面已经提到)、质子流(current of protons, J_{H^+})以及质子传导性(conductance of protons, $C_M H^+$),后者被定义为流经某组分的质子流量除以跨越这一组分后的势能降。在以后的章节中,我们常要用到这些参量。

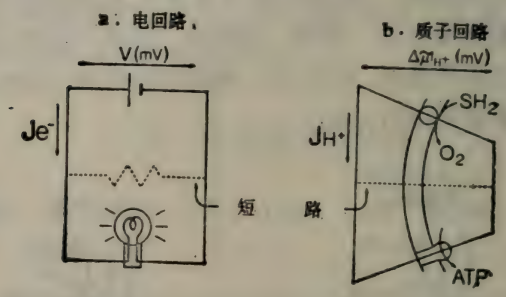


图1.3 质子循环和电流循环是很相似的。两者都有势能发生器(分别为电池和呼吸链),两种势能(电位差和质子电化学势能差)都是以伏特(V)或毫伏(mV)来表示的,而且都能用来做功(点灯和驱动ATP合成酶)。两种循环都能形成短路。在电池和在呼吸链中,化学转化速率都是与循环其余部分的电子流和质子流紧密相关的,这些又依赖于这部分的电阻。电位随电流的增加而下降。

显然,为了防止短路,膜必须是封闭的并对质子具有高阻抗。对这个假设十分有利的支持之一是,许多氧化作用与ATP合成作用的解偶联剂都是通过增加膜的质子通透性,引起短路而起作用的(图1.3)。为了能使带有负电荷的代谢物进入线粒体带负电的内部,化学渗透假说还包括了一项建议:存在着一个传送系统,代谢物可与质子一起作为中性物质被运

输,或者与OH交换而输入(Mitchell, 1961,1966).

关于"化学渗透假说"或者"Mitchell理论"的构成,有一个值得重视的词义的混淆。在本书中"化学渗透"这个词与上述的化学渗透假说的中心法则是同一含义,即偶联作用是通过质子电化学梯度作为中间媒介而发生的。关于泵作用的精确的分子机制,Peter Mitchell 等人还提出过许多辅助假说。但是必须强调指出,中心法则的正确性不依赖于这些辅助理论的"前途".

1.3 能量转换细胞器

1.3.1 线粒体与亚线粒体颗粒

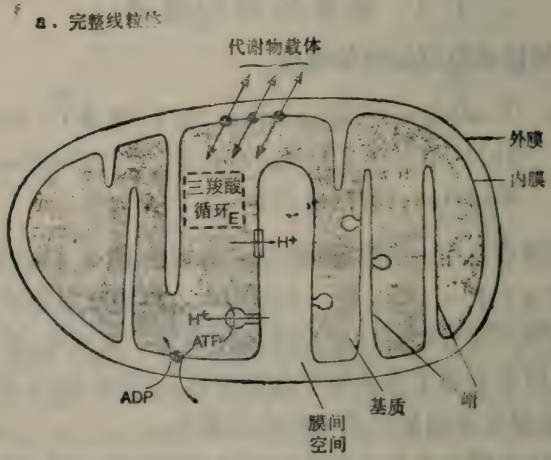
综述 Nedergaard与Cannon,1979(制备); Munn, 1974(形态研究);Harmon等,1974;DePierre与Ernster,1977(酶的定位)

在超薄切片中,典型的线粒体的外观如图1.4所示. 线粒体一般为0.7—1 μm长。在细胞中它们的形态并不固定且经常变化. 而且线粒体中的嵴的外观也十分不同,不仅对从不同组织中分离出来的线粒体是这样;甚至对同一个线粒体,当它悬浮在不同的介质中时也是如此。

线粒体外膜上有起非特异性孔道作用的蛋白质,它们允许分子量小于10,000D(道尔顿)的溶质通过(Zalman等, 1980);线粒体内膜则具有能量转换功能. 若一个组织的呼吸活力较高,则从该组织分离出的线粒体中,由广泛延伸的内膜卷曲而成的嵴就较多。线粒体制剂经过磷钨酸盐负染,于其内膜的基质侧(M侧),可以观察到许多球状突出物,它们是ATP合成酶的催化亚基. 参与三羧酸循环的酶都位于基质中,仅有琥珀酸脱氢酶例外,它结合于内膜的M侧。NAD与

NADP 的基质库是与它们在细胞质中的库分开的，然而基质中的 ADP 和ATP则通过腺嘌呤核苷酸交换因子（adenine nucleotide exchanger)与细胞质相联系。

线粒体一般是在等渗的蔗糖溶液中经过和缓的匀浆而制备的。随后再通过差速离心将线粒体与细胞核、细胞碎片及微粒体(内质网的片段)等分开。尽管这种方法对于那些象肝一类的脆弱的组织比较有效，但是对于象心脏等比较坚韧的组织，则必须或首先要与蛋白酶(例如 nagarse)一起保温，或



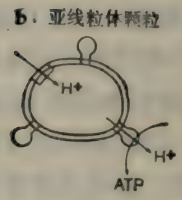


图1.4 由线粒体得到的制剂

用捣碎机短时间地处理，以打碎肌纤维。用蜗牛酶消化酵母菌细胞壁后可分离得到酵母线粒体。

线粒体经超声解离产生内翻外的亚线粒体颗粒（SMPs）（图1.4），也叫作电子传递颗粒（ETPs）。因为它们的外侧表面上具有呼吸链和ATP合成酶二者的底物结合部位，所以应用十分广泛（见Lee，1979）。

1.3.2 呼吸细菌及有关制剂

综述 Kaback，1974；Konings，1979

虽然细菌能量转换作用的某些方面可以用完整的细菌来研究，但是细菌细胞壁，特别是革兰氏（染色）阴性细菌的细胞壁，却会引起通透性问题。由于这个原因，人们常常使用经过溶菌酶消化去除了细胞壁的球状体（sphaeroplast）（图1.5）。球状体的内含物以及方向性均保持不变，但是渗透敏感性提高了。

假如球状体在极高的压力下从French压力器（French press）的一个小孔中挤出，它们就会形成类似于亚线粒颗粒的泡囊（vesicle）。反之，球状体经低渗溶胞作用可产生保持原有极性的空膜泡囊（"空壳"，ghosts）。即所谓的"Kabacko体"。

1.3.3 叶绿体

综述 Park与Sane，1971

叶绿体是质体的变种之一，或者是绿藻及高等植物中特有的泡囊；每个细胞中可能有1到100个叶绿体不等。叶绿体的直径为4—10μm，厚为1—2μm（图1.6），与一般线粒体相

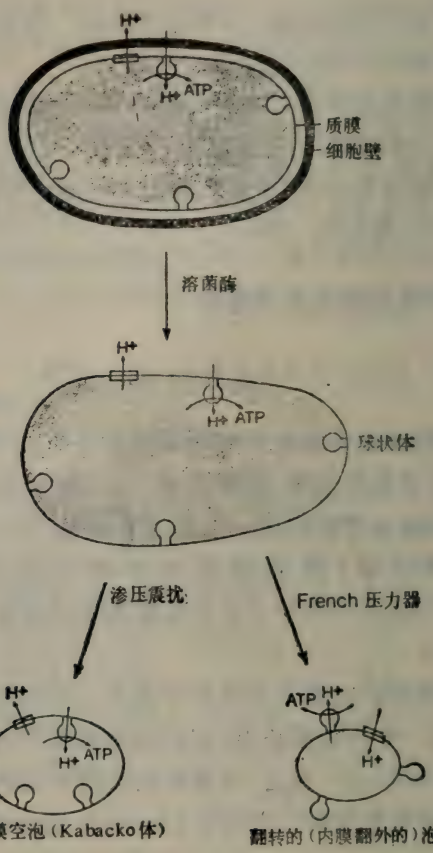


图1.5　由呼吸细菌得到的制剂

比要大得多。它们被一个含两层紧密相对的膜的包被（envelope）所包绕，内膜里的内含物是基质（stroma）。基质中有许多扁平的泡囊称为类囊体。数个类囊体会堆砌在一起于特定的区域形成基粒。类囊体膜上含有光合成色素及光合成电子传递载体。这类膜是能量转换膜，而且光可以引发质子注入类囊体的内部空间。叶绿体的ATP合成酶就结合在类囊

体膜上,并将它的"球状突出物"定位于该膜面向基质的一侧。由光合磷酸化作用生成的 ATP 和 NADH,被用在基质内卡尔文循环(Calvin cycle)的固定CO_2的暗反应中。

尽管乍看上去叶绿体的样子与线粒体十分不同,实际上它们唯一的形态差别是,与线粒体的嵴相比,叶绿体的类囊体已与它们各自的内膜分离开,结果就使得类囊体空间形成了各自独立的分隔间,而不是象"嵴空间"那样与线粒体的膜间间隔相连。

在等渗的蔗糖或山梨糖醇溶液中(溶液为pH8.0,以补偿由于酸性液泡破裂造成的酸化),将叶子温和地匀浆即可制得叶绿体。经纱布过滤后,所得的悬浮液先以慢速离心除去碎

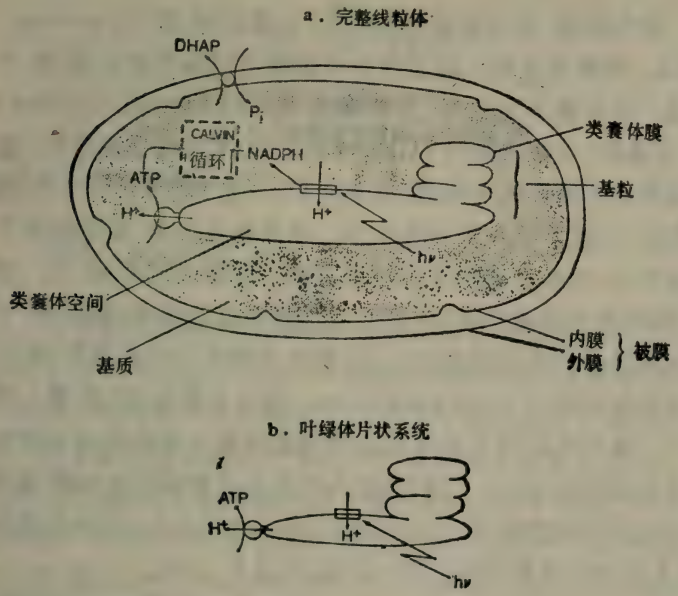


图1.6 由叶绿体得到的制剂

(a)完整叶绿体. (b)破损的叶绿体(注意类囊体膜仍是完整的).

片，一般再经1,000—2,000g，4分钟的离心即可把叶绿体沉淀下来。用这种制备方法得到的叶绿体具有几乎完整的内膜和外膜(完整叶绿体)。由于保存了基质，所以它们显示了高效率的CO_2固定作用，但是因为那些完整的膜阻止多种底物及抑制剂与类囊体膜相互作用，故它们在生物力能学研究中用途有限。

在0.35 mol/L氯化钠溶液中制备的叶绿体，其内、外膜都受到损伤(破损的叶绿体)，不能固定CO_2，但允许底物和抑制剂接近类囊体。

1.3.4 光合细菌与载色体

综述 Clayton与Sistrom，1979

绿色细菌、紫色细菌(紫色菌)以及蓝细菌(cyanobacteria，或称作蓝藻)这三种原核生物可以催化光合成电子传递。紫色菌分为两类，即红螺菌科(Rhodospirillaceae)(或无硫的)与红硫菌科(Chromatiaceae)(或含硫的)。蓝细菌进行非循环电子传递(见第6.4节)，它利用H_2O作为电子供体，在这方面与叶绿体相似。在其余几组中，紫色菌研究得较详尽，有两点使得它们很适宜用于生物力能学研究。首先，对细胞的机械性破坏(例如在法国式压力器中，在高压下将细胞悬浮液挤过纤细的小孔)能使内膜突出出来而形成一种叫作载色体(chromatophores)的独立的封闭泡囊(图1.7)。载色体保留了光合成能量转换的能力并具有与亚线粒体颗粒相同的取向。它们可作为研究电子传递与化学渗透能量转换作用的基础单位。紫色菌的第二个优点是，它的反应中心(主要光化学复合体)易于分离(见第6.2节)。

除这些细菌外，嗜盐菌进行一种独特的依赖光的能量转换作用，在该作用中，一种单一蛋白质，细菌视紫红质(bacte-

riorhodopsin)作为光驱动质子泵(见第6.6节)。

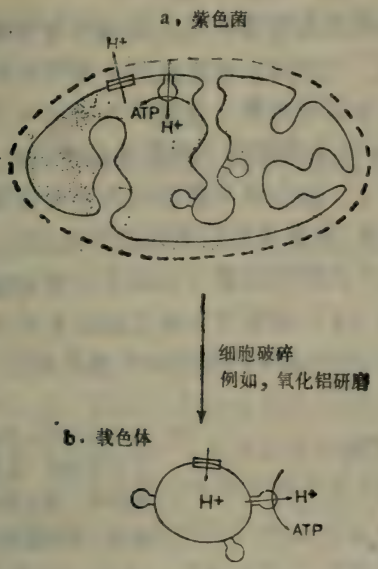


图1.7 由光合细菌得到的制剂

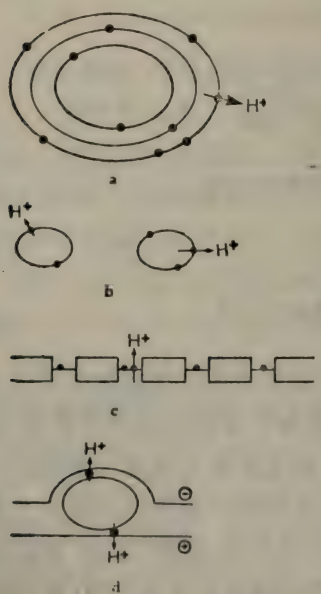
1.3.5 重组体系

综述 Kagawa,1972;Racker,1975

化学渗透理论的基本特征乃是认为氧化磷酸化作用可从功能上及结构上分为氧化、质子移位与磷酸化以及质子移位复合体。同时对于光合磷酸化作用也应有可能进行类似的剖析。质子移位复合体经纯化后必须进而被重新嵌入到人工合成的、封闭的膜上,以便观察质子移位作用。这种"重组"具有双重价值。首先,它可以检验化学渗透理论的各个方面(是否所有的能量转换复合体都泵出质子?是否每个复合体都作为一个自主单位泵出质子,或者仅仅当它们与一个假设的质子泵一起分离出来时才能泵出质子?)。其次,它还可以确定作为

研究泵机制开端的最小功能单位。

这些复合体是在无变性作用去垢剂中增溶溶解后被分离的（见第5.5节）。它们可以被重组到各种合成膜结构中（图1.8）。将这些复合体与磷脂一起超声可得到单层壁的微泡或称脂质体(图1.8b)。或者用另一种胆酸盐透析法，即在胆汁盐类胆酸盐的存在下，复合体与磷脂的悬浮液被透析以便逐步降低去垢剂的浓度，导致多层脂质体的形成(图1.8a)。还可以将脂质体融合到平面脂双层膜上以便直接测定电位（Drachev等，1974；图1.8d），或者可在微孔滤纸上形成平面状脂双层膜(Skulachev，1976；Blok等，1977；图1.8c)。



(a) 胆酸盐透析：复合体与天然或人工合成磷脂一起悬浮在胆酸盐溶液中，通过透析缓慢地除去去垢剂，多层脂质体自行形成。

(b) 超声：复合体和磷脂在没有去垢剂的溶液中超声，形成单层脂质体

(c) "微孔"-支撑双分子层：在滤膜的微孔上形成含有嵌入的复合体的双分子层膜，可得到总面积很大的平面膜。

(d) 脂质体与黑脂膜直接融合，可以直接测量电位。

图1.8 某些质子移位复合体重组体系

重组后的复合体的取向会出现一些问题。有时曲率高的膜影响嵌入的蛋白质取向一致，但通常它们的嵌入是随机的，

为了防止复合体在彼此相反的方向上工作，所有的底物必须是不通透(双分子层)的，以便只有那些底物结合部位朝外的复合体才表现其功能。

1.4 化学渗透假说的背景

综述 Mitchell，1966，1968，1976b，1979a、b；Greville，1969

本节意在简要概述化学渗透假说最初发表(Mitchell，1961)的几年中，这一假说与其他能量偶联假说间的关系。这样处理存在着两个问题：第一，它以生物力能学背景知识为先决条件，所以这一领域中的初学者大概宁愿先略去这一节，直到对(生物力能学)概念比较熟悉时再来读它；第二，许多已具备必要背景知识的读者，则很可能不同意作者对这一混乱时期的解释。无论如何，本文最终还是保留了 Greville 关于经典的化学渗透假说的详尽研究(Greville，1969)。

到了六十年代初期，在线粒体内除了重要的能量转换中间物尚未鉴定出外，主要的能量转换途径都已确立(见Ernster与Lee，1964)。因而任何假说都能与一些基础观察相吻合：

(a)呼吸链(或"电子传递链")是一个电子载体的线性序列，具有三个分开的区域，在那里氧化还原能量可以在 ATP 合成作用中贮存起来。

(b)呼吸作用的速率受ATP需求量的控制(呼吸控制)。

(c)呼吸作用与ATP合成间的偶联可以被一组称作"解偶联剂"(uncoupler)的试剂所破坏。这些试剂消除了呼吸控制(即在没有ATP合成的情况下激发呼吸作用)外，并使线粒体催化ATP迅速水解("解偶联剂激活的ATP酶")。

(d)抗菌素寡霉素(第7.2节)不仅抑制ATP合成，而且抑制解偶联剂激活的ATP水解。

(e)来源于呼吸作用的能量，不仅可以与ATP的合成相偶联，也可以与Ca^{2+}的积累以及NAD^+和$NADP^+$的还原相偶联，尽管这两个过程都是需能的。

(f)在厌氧线粒体中，当这些过程能被解偶联剂以及寡霉素一起抑制时，可以通过ATP的水解来驱动它们。

这些能量转换途径(图1.9a)可以通过假设一个共同的能量转换中间物波纹曲线"～"("squiggle")更合理地说明。有关这种中间物的唯一先例是来自糖酵解和由甘油醛-3-磷酸

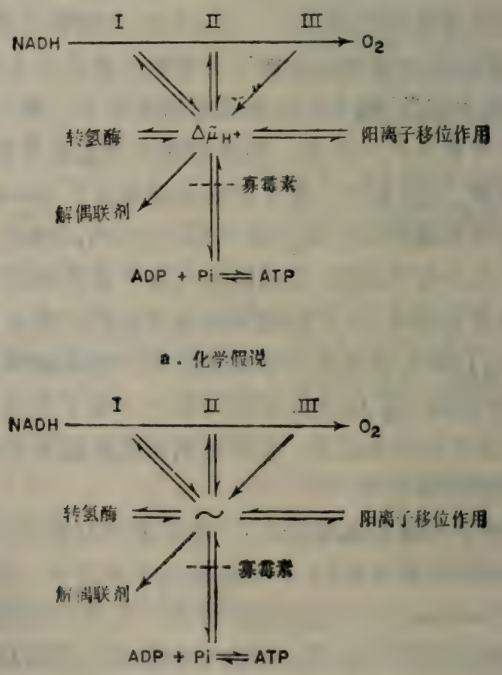
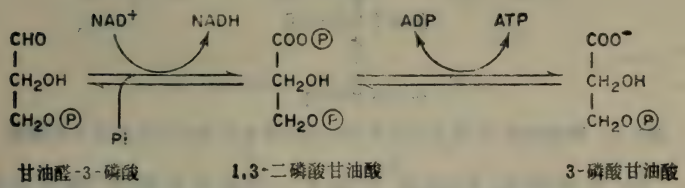


图1.9 线粒体的能量转换途径

脱氢酶和磷酸甘油激酶所催化的底物水平磷酸化（图1.10），在该反应中氧化还原状态的改变导致形成具有负的高水解Gibbs能量的磷酸键，即所谓的“高能键”的形成。它将被转移到ADP上。为了使“化学偶联”适合于线粒体，需要有两个附加步骤，一是允许三个“磷酸化部位”都产生共同的中间物，二是解释某些不依赖于磷酸的能量转换途径(图1.10)。随后由于发现了线粒体能积累一些阳离子如 Ca^{2+}，使得比较简单的公式也相当繁杂了(见第8.4节)。为此，必须提出波纹曲线驱动的阳离子泵(图1.11c)，或是随着对于依赖呼吸作用的质子运动增加的信息(图1.11b)，提出波纹曲线驱动的质子泵。

a．糖酵解中的底物水平磷酸化



即：

$$A_{red} + B_{ox} + Pi \rightleftharpoons A_{ox} \sim Ⓟ + B_{red} \xrightleftharpoons{ADP \quad ATP} A_{ox}$$

b．氧化磷酸化作用中的假设的化学偶联

$$A_{red} + B_{ox} + I \rightleftharpoons A_{ox} \sim I + B_{red}$$

$$A_{ox} \sim I + X \rightleftharpoons A_{ox} + X \sim I$$

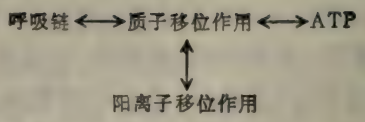
$$X \sim I + Pi \rightleftharpoons X \sim P + I$$

$$X \sim P + ADP \rightleftharpoons X + ATP$$

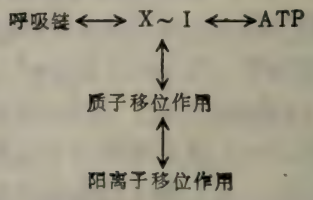
$$A_{red} + B_{ox} + ADP + Pi \rightleftharpoons A_{ox} + B_{red} + ATP$$

图1.10　通过化学偶联合成ATP

a、化学渗透



b、化学中间物驱动的质子泵



c、化学中间物驱动的质子泵

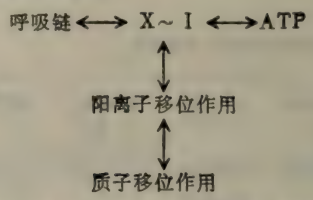


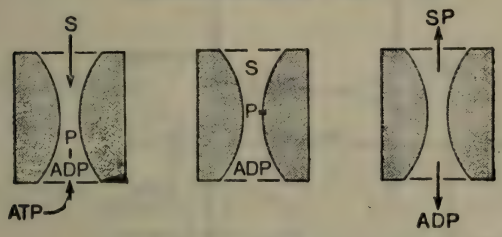
图1.11 呼吸作用、阳离子移位作用和质子移位作用之间的相互关系图解

对"化学假说"的验证，取决于一个或多个所谓"高能中间物"的鉴定与分离，对此一般并无异议。但是，尽管假说已事先预言到会有三种中间物是呼吸链组分(如 NAD^+ 或细胞色素)的衍生物，而且似乎是经得起光谱检验的，可是除了一些无关的东西之外，并没有任何中间物被真正鉴定出来。

化学渗透假说并不是来源于氧化磷酸化作用，而是来源于Mitchell早期关于跨越细胞膜的"主动运输"机制的研究工作，特别是关于看起来无方向性的化学反应如何产生一种定向的跨膜移位作用。Mitchell提出，运载蛋白(transport protein)具有这样一种结构，使底物和产物必须沿着特定途径接近或者离开催化部位(图1.12)。在图1.12a的假设的例子中，磷酰基团"P"穿越蛋白质，从ATP到"S"作定向转移。

Mitchell 命名这一过程为"定向基团移位作用"(vectorial group translocation)。图 1.12b 给出了一个更为复杂的例子,其中催化$2H^{+}+2e^{-}$从还原态底物AH_2向B 转移的蛋白质,具有可以使质子与电子沿着不同通路离开的结构。这事实上是关于质子经呼吸链移位的 Mitchell 模型的基础。在一个包括两个部分的回路中,电子从给体A 向受体B 转移,在第一

a. 磷酰基"P"从ATP向"S"(底物)的定向转移
(按Mitchell和Moyle, 1958)



b. 质子的定向移位(按Mitchell, 1979 a)

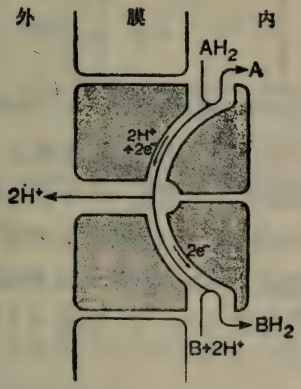


图1.12 假设的定向基团移位模型

部分中,AH_2中的2H(或更为正确些,$2H^{+}+2e^{-}$)结合在辅基如FAD上;第二部分由如铁硫中心(第 5.2 节)等纯电子运载

辅基组成。当 $2H^+$ -载体把电子传递给电子载体时，多余的质子就会按照一定的方向被释放到膜的一侧(图1.12)。化学渗透为离子和代谢物依赖能量的跨膜运输提供了一个现成的解释。这种运输或者是初级的(直接与基团移位反应的代谢相关联)，或者是次级的(通过利用初级反应产生的电化学梯度而与之间接关联)(见图1.13)。

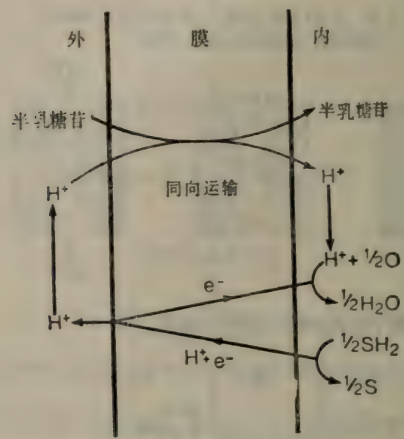


图1.13 大肠杆菌吸收 β-半乳糖苷的化学渗透图解

Mitchell 曾强调 (1961) 将电子流偶联于质子移位的模型并非新东西，可以追溯到二十世纪 40 年代 (见 Lundegårdh，1945，图1.14)。Mitchell 1961年假说的新颖之处在于提出了线粒体与光合膜的ATP合成酶同样也可以转移质子，这样就能利用电子传递产生的 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 去驱动 ATP 的合成 (图 1 15)。

与化学渗透假说同时，Williams(1961)提出了一个假设的偶联机制，也包括了质子及电荷的分离。但是在他的理论中，质子被限制在膜内只是间接地和溶液本体相关联(综述见Williams，1976，1978a)。这两位作者未能就两个假说应

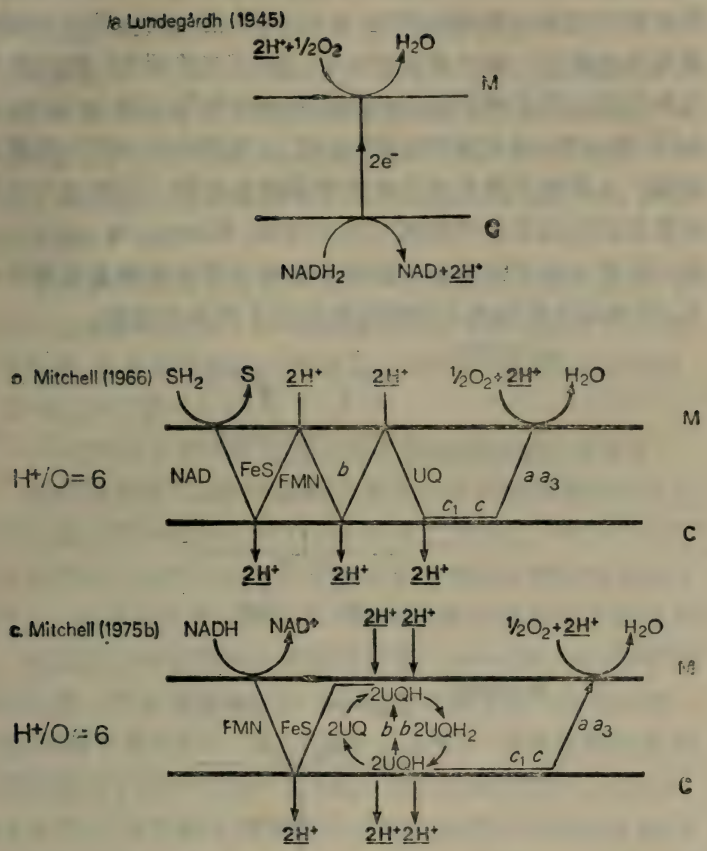


图1.14 质子经电子传递链移位的假说

得到的正确的历史优先权问题取得一致意见(见 Mitchell, 1977, Williams, 1978b)。

由Mitchell所提出并发展了的化学渗透假说始终与基因定向移位作用的概念密切相关。在定向移位作用中，呼吸链中的蛋白质作为辅基的载体及在限制定向途径上的作用都

是十分被动的。Boyer(1965)首先提出了关于在氧化还原过程中蛋白质的构象可以改变,而且ATP酶也可以发生类似构象变化的概念。由于最初提出时,这个"构象理论"假设在氧化和还原作用中呼吸链中的构象改变直接传递给最接近的ATP合成酶,后者所产生的"应力"提供了合成ATP所需的能量。这样就不存在质子电化学梯度的作用。尽管这个直接构象偶联假说未能经得起时间的考验(见Boyer等,1977),但是它着重于质子移位作用的分子机制中蛋白质构象改变这一点,作为基团移位作用的替代物得到了更多的支持。

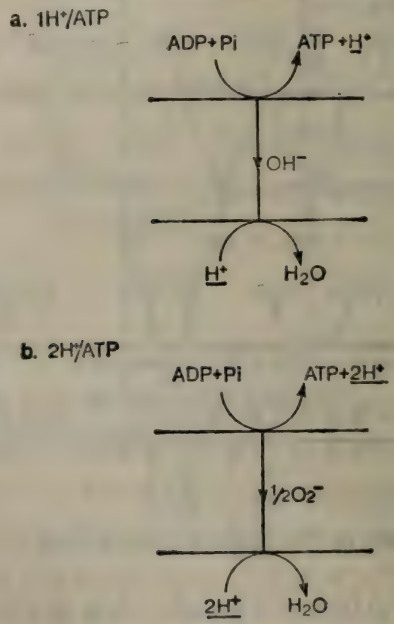


图1.15 ATP合成酶的定向基团移位模型
(按Mitchell,经Greville修正,1969)

化学渗透假说对生物力能学者巨大的吸引力,在于它使人们立即联想到许多实验都可以用来验证这一假说。结果出

现了三个主要的互相独立的辩论。首先，中心法则是否正确，质子电化学梯度是否必要并足以进行能量转换作用？其次，质子回路是象 Mitchell 所说的离开了原位到达本体溶液或是在各个呼吸链及 ATP 合成酶复合体之间存在着局部的质子微回路，即更与 Williams 的建议相接近？第三，在质子移位的分子机制中，定向基团移位作用与蛋白质构象变化各有何重要性？

Mitchell 为质子电化学偶联中心法则的实验验证准备了四项基本的必要条件，一些较重要的实验将在这里简要地予以回顾，更为完整的论述可在Greville(1969)或Mitchell (1976b)的文章中找到。

(i)呼吸电子传递链和光合电子传递链能够转移质子

最早报导在"破损的"叶绿体制剂中存在着依赖能量的质子移位作用(Neumann 和Jagendorf, 1964)。Mitchell和Moyle(1965, 1967a)通过向无氧线粒体悬液中瞬时间加入少量的 O_2 并追踪介质的酸化作用证明了线粒体的质子移位作用。低浓度的解偶联剂加速缺氧作用 (anoxia) 后质子梯度的崩溃。发现质子逐出的化学计量与质子移位作用中是一致的(即每个循环$2H^+/2e^-$)(见第 5.4 节)。在连续呼吸作用过程中发现了高于200mV的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$(Mitchell和Moyle,1969a, 第 4.2 节)。在反转了的亚线粒体颗粒中质子移位作用的方向是相反的(Mitchell和Moyle, 1965)。Skulachev和他的同事们证明(Skulachev 等,1970)，线粒体能够利用质子梯度积累多种人工合成的亲脂阳离子 (lipophilic cations)，而具有相反极性的亚线粒体颗粒和载色体则积累相应的阴离子。由于线粒体不太可能演化出一种特异于这些合成离子的能量驱动离子泵，故表明那种阳离子泵 (图 1.11c) 是不可能的。最后，关于纯化的呼吸复合体在重组体系中具有独立的

质子泵功能的实验(见第5.5节),证明它们和另一种"～"驱动的一般质子泵化学假说是不一致的(见图1.11c)。

(ii)ATP合成酶应当具有双向质子移位ATP酶的功能

向无氧线粒体悬液中加入少量的ATP后即会引起质子释放,随后释放作用又缓慢地衰减,但是能被解偶联剂加速(Mitchell和Moyle,1968)。纯化后重组的ATP合成酶催化相似的质子移位作用(Kagawa等,1973;见第7.4节)。ATP的水解能够保持$\Delta\mu_{H^+}$在200mV以上(如Nicholls,1974),而人工势能则可以驱动ATP的合成(Jagendorf和Uribe,1966)。

(iii)能量转换膜应具有低效率的质子传导性

在合成的脂双分子层膜上引起质子通透性的试剂同时能够使线粒体解偶联,从这一平行反应可以推知膜具有低的质子通透性。Mitchell和Moyle(1967b)通过跟踪加入HCl所形成的pH梯度在质子进入线粒体基质时的消减速率,更为直接地测定了质子通透性。

(iv)能量转换膜应具有特异的交换载体以允许代谢物通过膜,而且在高膜电位之下仍能保持渗透稳定性。

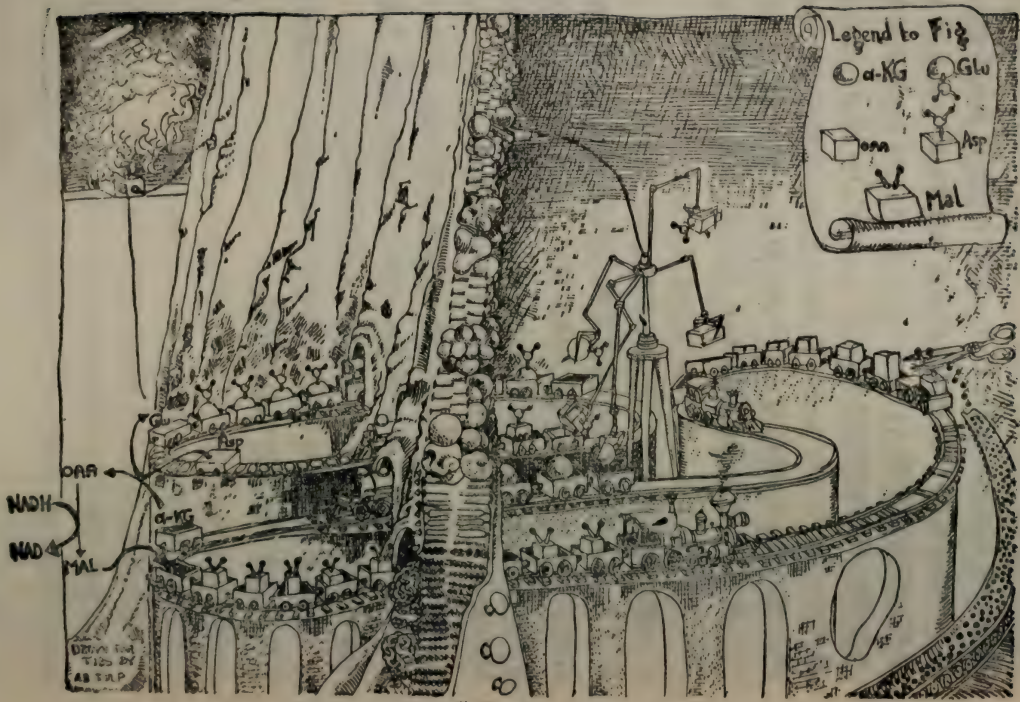
阴离子如琥珀酸盐、Pi、丙二酸盐以及Na^+等可以加速呼吸作用突发后ΔpH的减少(Mitchell和Moyle,1967b),这表明阴离子可以随质子一起被运输Na^+则与质子交换。Chappell及其同事(Chappell和Crofts,1966;Chappell和Haarhoff,1967;Chappell,1968)根据非呼吸线粒体在铵盐中膨胀的速率,得出了关于许多运输体系的证据,在这些体系中阴离子主要是以与质子一起被运输或者与它种阴离子相交换这种不带电荷的形式被运输的(见第8.3节);同时见Mitchell和Moyle(1969b)。

关于化学渗透假说的第二个辩论涉及的范围,即质子回路的定域不受膜的约束而到达总相(bulk phase)。一些工作

者(例如Rottenberg,1975, Kell,1979)根据有时可以观察到的在呼吸作用和$\Delta\mu_{H^+}$之间关系上的差间,提出了局部质子回路(local proton circuits)。然而也存在相反的争论,支持质子回路不受整个能量转换细胞器的限制,例如单分子的质子移位体短杆菌肽(gramicidin,见第2.5节)对整个叶绿体产生可检测到的解偶联作用(Junge和Witt,1968),而在嗜盐菌(halophilic bacteria,见第6.6节)中,细菌视紫红质泵集中于膜的某一区域是与ATP合成酶复合体相分离的。随着争论的继续,本书将借助Occam的剃刀,采纳较简单的不受限制的解释。

第三个是关于分子机制的辩论,仍然是悬而未决并将继续下去,直到我们能象目前了解血红蛋白的氧合作用反应那样细致地研究了呼吸链复合体的氧化作用和还原作用。在质子排出作用的化学计量和氧化还原载体的顺序两个方面,Mitchell的基团移位机制都作了严格的要求(见第4.3节和5.4节)。目前(1981年)有一种倾向,即与那些在线粒体电子传递链和ATP合成酶机制领域工作的人们相比,研究细菌和光合磷酸化作用的工作者们更为支持基团移位(理论)。

然而必须再次强调的是,中心法则有着坚实的实验基础,它也将是本书的其余部分的基础。



苹果酸-天冬氨酸的穿梭往返使还原当量从细胞质的NADH运输至线粒体基质(图8.2)

2 跨越能量转换膜的离子运输

2.1 引　言

化学渗透假说的出现使人们考虑离子运输过程的方式有了一个较大的变化。起初它被看作是一种第二级现象，随着依赖于能量的离子运动被归于能量转换作用的支路，关于离子运输的研究就成了生物力能学的一项中心课题。特别是能够把离子载体及脂溶性离子在能量转换膜上的作用与它们在无蛋白的人工脂双分子层膜上的作用相互联系起来，这是与跨膜电位（trans-membrane potential）在能量转换作用中的主要功能相一致的。本书讨论膜的基本渗透性质及离子载体在离子渗透中引起的特异附加途径的作用。

2.2 能量转换膜的结构

综述　Depierre和Ernster，1977

膜结构的流动-镶嵌模型（fluid-mosaic model，Singer和Nicolson，1972）很适于解释能量转换膜的性质（图2.1）。在这个模型中绝大多数磷脂将其极性头部基团置于两侧与水相的交界面而排列成双分子层。根据膜蛋白埋在双分子层疏水核心中的深度，它们可以是界面性的（外部的），或是整体性的（内部的），某些整体性蛋白质穿过膜，允许蛋白质催化的运输作用跨膜进行。本章将强调由蛋白质催化的运输和跨越双分子层区域的运输之间的区别。

尽管流动-镶嵌模型通常被描绘成在类脂的海洋中漂浮着座座蛋白质“冰山”，但是在能量转换膜中蛋白质的比率高(在线粒体内膜中整体蛋白占膜的50%，外周蛋白占25%，类脂占25%)，导致它们排列比较紧密，而双分子层不到膜的60%。

能量转换膜也倾向于具有不同的类脂组份：线粒体内膜中10%的脂是心磷脂；叶绿体类囊体则仅有10%的脂是磷脂，其余为半乳糖脂(40%)、硫脂(4%)和光合成色素(40%)。尽管类脂组成不同，但是不同膜的脂双分子层区域的天然渗透性及由离子载体诱导出的渗透性却十分相似，这足以证明在能量转换膜和人工脂双层膜制剂间的互相推论是正确的。然而，不论是在一定的细胞器中还是在各个组织中，都可以有独特的蛋白质催化的运输。例如鼠肝线粒体内膜具有一些蛋白质催化的运输特性，是鼠心脏线粒体所没有的(见第8.3节)。

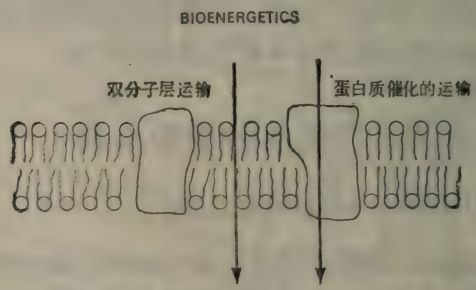


图2.1　流动-镶嵌模型

流动-镶嵌模型的一个推论是运输可以通过膜的双分子层区，也可以经过蛋白质。这两种模式的特性截然不同。

2.3　离子运输的途径

离子的跨膜运输不仅需要途径，而且需要驱动力。驱动力

可以是浓度梯度、电位、代谢能量或它们的集合，这将在第三章中谈到。本章探讨存在于能量转换膜中的天然途径及经诱导而产生的途径。

这里有几个可以对任何运输过程提出的问题：

(a)是离子独自通过了膜呢？还是它的运输又直接与其他离子的运动相偶联(图2.2)？

仅包括单一离子的运输过程称为"单一运输"(uniport)。例如象跨越线粒体内膜的Ca^{2+}离子吸收途径(见第8.4节)，以及加入质子移位体(proton translocator)二硝基苯酚后在脂双层膜上产生的质子通透性(见第2.5节)。涉及两个或多个离子被强制偶联并行的运输过程称"同向运输"(symport)或"协同运输"(co-transport)。在细菌质膜上有几种H^+/代谢物跨膜同向运输的情形(见第8.5节)。那种一个离子的运动与相反方向的其他种类离子的运输相联系的等价紧密偶联过程则称为"反向运输"(antiport)或"交换扩散"(exchangediffusion)，这类例子有存在于线粒体内膜的Na^+/H^+反向运输活性(见第2.6节)，以及在双分子层上由离子载体(ionophore)尼日利亚菌素所催化的K^+/H^+反向运输(见第2.5节)。假若参与一个正常的同向运输或反向运输机制中的离子是H^+或OH^-，那么一般来说就不可能区分它是一类有H^+参与的同向运输还是一类有OH^-参与的反向运输。例如线粒体的磷酸盐载体(见第7.5节)可以被不同地描述为Pi^{-1}/OH^-的反向运输或者H/Pi同向运输。

(b)直接偶联的离子运动会产生跨膜电荷转移吗(图2.2)？

电中性运输不包括净电荷的跨膜转移。运输的电中性可以起因于不带电物质的单一运输，也可以是一个阳离子和一个阴离子的同向运输，或者是两个带有等量电荷的离子反向

运输的结果，尼日利亚菌素催化的K^+/H^+反向运输就是后者的一个例子。带电的运输常被称为“电致的”(electrogenic,“产生电位”)或“电泳的”(electrophoretic，由已存在的电位所引起运动)。由于这些名词能够适用于不同条件下观察到的同样途径，所以这里将使用综合性的词“带电的”(electrical)。

把这里讨论的分子水平的电平衡与跨越某一特定膜的全部离子运动的电中性相互区别开是很重要的。后者是基于未建立一个高的膜电位就不可能再分出多于一个分量的跨膜的正负电荷。因此，分离跨越1 mg线粒体内膜的1nmol电荷会导致建立200mV以上的膜电位（第4.2节）。然而这并不排除出现个别分子水平的电现象，只要它们能彼此补偿即可(第2.7节)。此外，还必须看到，一个紧密偶联的电中性反向运输体(antiporter)对能量转换膜的影响，与加入同一离子的两种带电的单一运输体(uniporter)所起的作用是不同的。

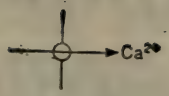
(c)运输与代谢是直接偶联的吗(图2.2)?

运输和代谢的紧密偶联发生在化学渗透能量转换作用的中心即离子泵上。“主动运输”(active transport)这个词尽管限用于有这类转换作用发生的例子中，而不宜包括那些离子跨膜集聚的情况，但有时还是用在文章中。假若存在着膜电位或者运输是通过同向运输或反向运输而与另一种离子的“下向”(downhill)运动相偶联，那么离子不借助于离子泵也可以被跨膜集聚。例如，当离子泵(Ca^{2+}-ATP酶)在肌纤维内质网中积累Ca^{2+}的时候，由于膜电位的作用，同样的离子也跨越线粒体内膜而积累(第8.4节)。只有前一种情况可以被说成是“主动的”，而线粒体的Ca^{2+}积累则降低了电化学梯度。

基团移位作用（第1.4节）描述代谢与离子运输相偶联的特殊的分子机制。

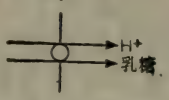
A（i）单一运输

例如：



（ii）协同运输

例如：



（iii）反向运输

例如：

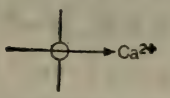
B（i）电中性

例如：

或者：

（ii）带电的

例如：

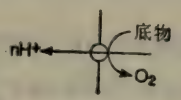


或者：

C（i）不直接与代谢相偶联
（ii）与代谢相偶联

例如：A和B中的任何例子

例如：



或者：

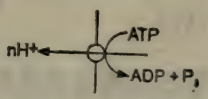


图2.2　离子运输的进一步分类

(d)运输是跨越膜的双分子层区域还是蛋白质区域发生的?

最终的分类直接来源于膜的流动镶嵌模型。因为双分子层运输可以适用于不同的膜,而蛋白质催化的运输则必须考虑到特殊的膜,所以区分是困难的。这两种运输形式的特点很不相同,是值得分别讨论的。

2.4 双分子层区域的自然通透性

类脂双分子层的疏水核带*对荷电物质的通行成了一个有效的屏障。所以除去几个重要的例外(第2.5节),双分子层对于正、负离子都是不通透的。这种不通透性延及质子,由于它避免了质子流短路(第4.5节),所以这个性质对于能量转换作用是极为重要的。双分子层不仅具有高电阻,而且还能耐受极高的电场。对一个具有200mV膜电位的能量转换膜即有一个300,000$V \cdot cm^{-1}$以上的电场跨越其疏水核带。

多种不带电的物质能够通过双分子层,H_2O、O_2和CO_2以及一些不带电的低分子量的酸、碱如氨和醋酸,都是高度可通透的。这类酸碱的通透性为研究跨膜的pH梯度提供了有益的工具。

2.5 双分子层区的离子载体导致的通透性

综述 Henderson, 1971; Pressman, 1976; Gomez-Poyou和Gomez-Lojero, 1977; ovchinnikov, 1979

双分子层区的离子通透性极低,其原因是离子穿入疏水

* 此处按原文应译为"核心",但它是延续的层带状的,故译为"核带"。——译者

区域需要高的活化能(activation energy)。由此可以推断，若能使电荷离位(delocalize)并被屏蔽，那么离子通透性就可能增加，这点可以用某些微生物产生的多种抗菌素和某些人工合成的化合物来实现。它们都被统称为离子载体(ionophores)。典型的离子载体是分子量500—2,000的化合物，它具有疏水的外表，因而是脂溶性的；又有一个亲水的内部以结合离子。尚没有证据表明离子载体是能量转换膜的天然组分，但是作为研究工具，它们是极为宝贵的。

离子载体可以通过作为流动的载体或是形成通道这两种机制来行使功能(见图2.3)。流动载体在膜内扩散，典型的离子载体每秒钟能够催化1,000个离子跨膜运输。它们对于不同的离子具有极高的辨别力，能跨越厚的合成膜工作，并受膜流动性的影响。相反，形成通道的离子载体的离子辨别力低，但是活性极高，每个通道每秒钟可催化高达10^7个离子的运输。

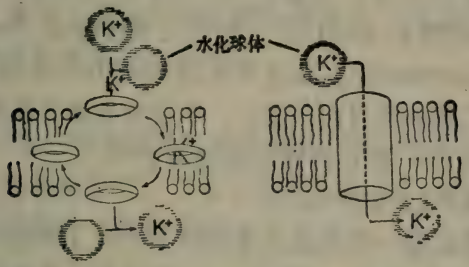


图2.3 流动载体(如缬氨霉素)型(左)与通道形成型离子载体(右)

2.5.1 不运输质子的电荷载体

缬氨霉素(valinomycin)

缬氨霉素(见图2.4)是一种流动载体型离子载体，催化Cs^+、Rb^+、K^+或NH_4^+的带电单一运输。它运输K^+的能力

至少比运输 Na^+ 的能力高 10^4 倍。缬氨霉素是来自链霉菌(Streptomyces)的天然抗菌素，是一种由羟基酸和氨基酸交替构成的缩肽（depsipeptide）。当离子与这种离子载体结合时，它们即失去自身的水合水(见图2.3)。Na^+不能够被缬氨霉素运输，是由于无水合水的 Na^+ 太小，以致不能与缬氨霉素向内的羟基有效地相互作用，因而复合能（complexation energy）不能与失去水合水所需的能量相平衡。因为缬氨霉素不带电且不含可解离的基团，它就获得了所结合的离子的电荷。未结合离子的和结合离子后的两种形式的缬氨霉素都能穿过膜扩散，所以催化量的离子载体即可引起大量离子的运输。对线粒体、叶绿体、合成双分子层膜来说，离子载体的浓度 10^{-9}mol/L即有效，对细菌则更低。

能量转换膜一般没有天然的带电 K^+通透性，这类离子载体的价值就在于它能够引起这种渗透性以便估计(第4.2节)或消除(第4.3节)膜电位或者研究离子运输(第2.3节)。

其他催化K^+单一运输的离子载体包括恩镰孢菌素(enniatin)和活菌素(nactin)〔所谓无活性菌素（nonactin)，单活菌素(monactin)，双活菌素(dinactin)，等等，是根据它们结构上乙基的数目而定的〕。不过这些离子载体并不象缬氨霉素那样对K^+的选择性明显地高于Na^+。

短杆菌肽(gramicidin)

短杆菌肽是一类形成通道的离子载体（见图2.4)，能在双分子层膜上形成一个瞬时的传导二聚体。它具有通道形成型离子载体的典型性质，在质子、一价阳离子和 NH_4^+间选择性很差，这些离子均以其水合形式通过(通道)。它传导离子的能力只受扩散作用的限制，从而一个通道每秒钟可传导高达10^7个离子。

2.5.2 不运输电荷的质子载体

尼日利亚菌素 (nigericin)

尼日利亚菌素是一个线状分子,具有含氧杂环和一个羟基。在膜上该分子环化形成一个类似缬氨霉素的结构,以氧原子作为疏水的内部。与缬氨霉素的不同之处是,尼日利亚菌素与阳离子结合时失去一个质子,而形成能够跨膜扩散的中性复合物,作为流动载体。尼日利亚菌素质子化的非结合形式也是可运动的,所以这个离子载体可以催化总体上电中性的K^+与H^+的离子交换(见图2.4)。能够催化同类电中性离子交换作用的离子载体还有X—537A、莫能菌素(monensin)和猎神霉素(dianemycin)。后二者对Na^+的选择性略高于K^+,X-537A实质上可以与包括有机胺在内的各种阳离子相结合。

尼日利亚菌素已用于研究阴离子运输(第2.7节)和调整跨越能量转换膜的pH梯度。据报导,尼日利亚菌素可消除跨膜ΔpH,事实上是这个离子载体使得K^+、H^+梯度平衡,最终的离子梯度要依实验条件而定。

A23187

A23187是一种含羰基的离子载体,对二价离子比对一价离子具有更高的特异性。它催化Ca^{2+}(或Mg^{2+})对$2H^+$的电中性交换而不破坏一价离子梯度。

2.5.3 质子与电荷的载体

质子移位体("解偶联剂")

质子移位体具有可解离的质子,并且可以作为质子化的酸或者其共轭碱而通过双分子层(图2.5)。这是由于这类离子载体有许多π轨道体系,它使得阴离子形式的电荷离位

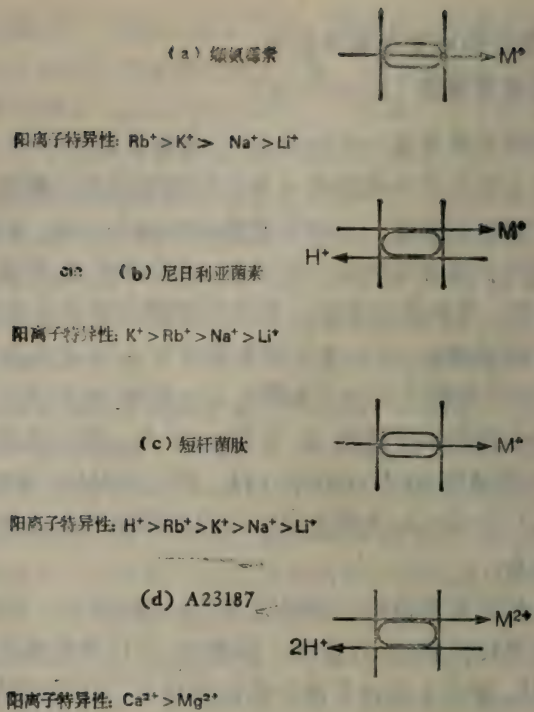
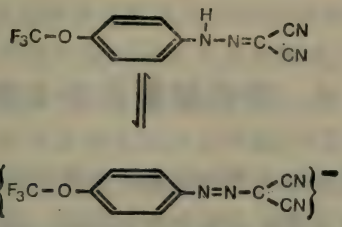


图2.4 一些由离子载体催化的运输过程

因而保持了脂溶性。通过跨越膜的往返运动,该离子载体能够催化质子的带净电荷的单一运输,从而增加了膜的质子传导性。在这种情况下质子流是"短路"的(第4.5节),使得$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$的制造者与ATP合成酶解偶联。在化学渗透理论形成前很久,人们就已经描述过某些化合物的解偶联反应,那些化合物大多数是通过增加合成脂双分子层膜的质子传导性而起作用的,这个论证是重要的证明之一,它对化学渗透理论有利,同时反驳了那种认为解偶联剂在水解假设的高能中间物时具有特定的功能的化学中间物理论。

一种离子的单一运输与同种离子与质子相交换的电中性的反向运输相结合，可以诱导膜上的间接质子移位作用。例如在膜上有K^+循环时，缬氨霉素和尼日利亚菌素的结合可以诱导H^+的净单一运输。

例如　羰基氰-对三氟甲氧基苯腙（FCCP）



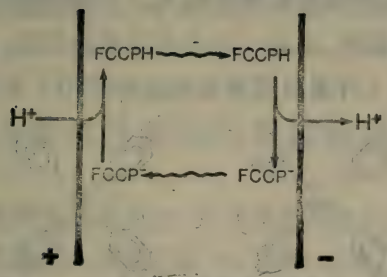


图2.5　质子移位体催化的质子跨膜单一运输

质子移位体（解偶联剂）是亲脂的弱酸，能够以质子化或是非质子化的形式透过脂双分子层。假如质子电化学电位（第3.4节）跨膜存在的话，质子移位体将作催化循环以"催毁"这一电位。$FCCP^-$会被膜电位驱赶到膜带正电荷的一侧（见第3、4节），FCCPH则会由于p^H梯度而被送至带碱性的部分。解偶联剂如FCCP能在$10^{-9}-10^{-5}$ mol/L的广泛的浓度范围内对膜起作用。

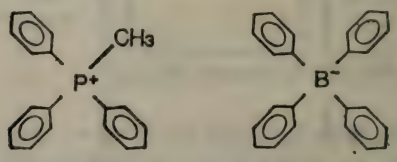
2.5.4　亲脂的阳离子与阴离子

π轨道体系使得电荷离位并能增强脂溶性的能力，已被用于多种阳离子和阴离子的合成中，这些离子甚至在带电荷

时也能被跨膜运输(图 2 .6)。严格地讲,这些离子并非离子载体,因为它们并不起催化作用,而是随$\Delta\psi$而集聚(第4.4节)。亲脂阳离子和阴离子,在阐明它们分别于线粒体和反转的亚线粒体颗粒内依赖能量的集聚方面,曾有重要的价值(第1、4节)。这些实验排除了由高能中间物驱动的特异阳离子泵的可能性(Skulachev,1971)。后来,这些阳离子被用于估算$\Delta\psi$(第4.2节)。

2.6 蛋白质催化的运输作用

由蛋白质催化的跨越能量转换膜的运输作用与依赖双分子层的运输作用通常是完全不相同的。无论有无离子载体的存在,都可以直截了当地予以说明。运载蛋白(transport protein)也具有其他酶类的特点:它们表现立体选择性;常能够被特异地抑制,并且一般是由基因决定的。后一个特点意味着不可能(对蛋白质催化的运输作用)做出与对双分子



甲基三苯磷 (TPMP⁺)　　硼酸四苯酯 (TPB⁻)

图 2 .6　亲脂离子实例

层运输作用同样的概括。例如,如果用 FCCP(图2.5)在线粒体中诱导质子通透性,一般可以假定它在叶绿体、细菌和合成脂双分子层中有同样的作用。可是一种运载蛋白可能就不仅是对一类特定的细胞器是特异的,并且可能是只限于来源于一种组织中的细胞器。例如柠檬酸载体存在于肝脏线粒

体中，参与运出脂肪酸合成所需的中间物(第8.3节)，而在心脏线粒体中并不存在这种蛋白。饱和动力学(satuation kinetics)有时被称为是以蛋白质作为中介的运输的特点。尽管有时这可能是真实的，但是任何运输过程的动力学都是如此复杂，所以对它必须小心地加以解释，特别是在存在膜电位的情况下。

涉及蛋白质的运输作用的最有力的证据是特异性抑制物的存在。例如，多年来丙酮酸被认为是能够通过双分子层进入线粒体的，由于它是一个单羧基弱酸，所以这样认为似乎是有道理的。然而，由于发现氰羟基肉桂酸盐(见第8.3节)是运输的特异性抑制剂，这就为载体的存在提供了第一个强有力的证据(见LaNoue和Schoolworth，1979)。

有关的运载蛋白经过多方研究，结果引起了名称的过剩，包括载体、通透酶、搬运体和移位酶等，所有这些都是运载蛋白的同义词。

2.7 大量溶质跨越能量转换膜的运动

线粒体悬浮液是浑浊的，并且能够使光发生散射。散射的光基本是基质和介质间折射率之差的函数，任何降低这一差别的作用都将会减弱这种散射光。增加基质的体积后由于可通透物质的流入，基质折射率接近于介质折射率，从而造成散射光的减弱。这就提供了一种研究溶质跨越线粒体内膜流入的十分简单的定性方法。由于线粒体的基质可以经受体积上的很大增加而不致涨破内膜，内膜仅需展开它的嵴就可以了。所以线粒体适于用这种技术来研究。"膨胀"可以进行得很充分，以使外膜破裂释放出那些定位于膜间空间(intermembrane space)的腺苷酸激酶。光的散射可以从一般分

光光度计中透射光的减弱来检测，也可以用90°几何荧光计直接测定，更为灵敏。

为了观察线粒体在离子介质中的渗透膨胀，必须满足两项要求。首先，介质中主要渗透成分的阳离子都必须是可以透过膜的；其次，必须考虑到对跨膜总电荷平衡的需求。可以把无论是没有呼吸链还是没有ATP酶功能的线粒体看作最简单的情况。在图2.7所示的例子中研究了鼠肝对Cl^-和CNS^-的通透性。线粒体悬浮在120mmol/L KCl溶液中或120 mmol/L KCNS溶液中几乎不膨胀，但是这并不能证明内膜对这些离子是不通透的，因为它对K^+的通透性很低。为了克服这一点，可以通过加入缬氨霉素来诱导K^+的带电单一运输（第2.5节）。缬氨霉素是一个离子载体，如同它能使人工合成膜产生离子通透性一样，完全可以预期它也能诱导内膜的脂双分子层区，产生同样的通透性。现在可以观察到，在KCNS溶液中线粒体迅速地膨胀，而在KCl溶液中则膨胀缓慢。因此似乎可以得出结论，即内膜对CNS^-是可通透的，而不允许Cl^-通过。幸运的是，由于电荷平衡而引起的问题尚未考虑到，尽管结论下得过早，但结果还是正确的。

为了解释这一点，图2.7中也介绍了线粒体在醋酸钾溶液中的膨胀情况。离子载体（缬氨霉素或尼日利亚菌素）的存在保证了不会因K^+不通透的问题而限制膨胀速率。然而线粒体的膨胀速率显然依赖于由离子载体诱导的通透性的性质：尼日利亚菌素只在醋酸钾溶液中有效，而缬氨霉素只有助于线粒体在KCNS溶液中迅速地膨胀。其原因在于对电荷平衡的需求。由缬氨霉素催化的K^+渗入是带电荷的，而醋酸盐则是作为电中性的、质子化了的酸通过双分子层的。所以迅速增加的高$\Delta\psi$值（内部带正电荷）会阻止K^+的进一步通透。醋酸的渗透作用也会逐渐停下来，这是由于与之协同传

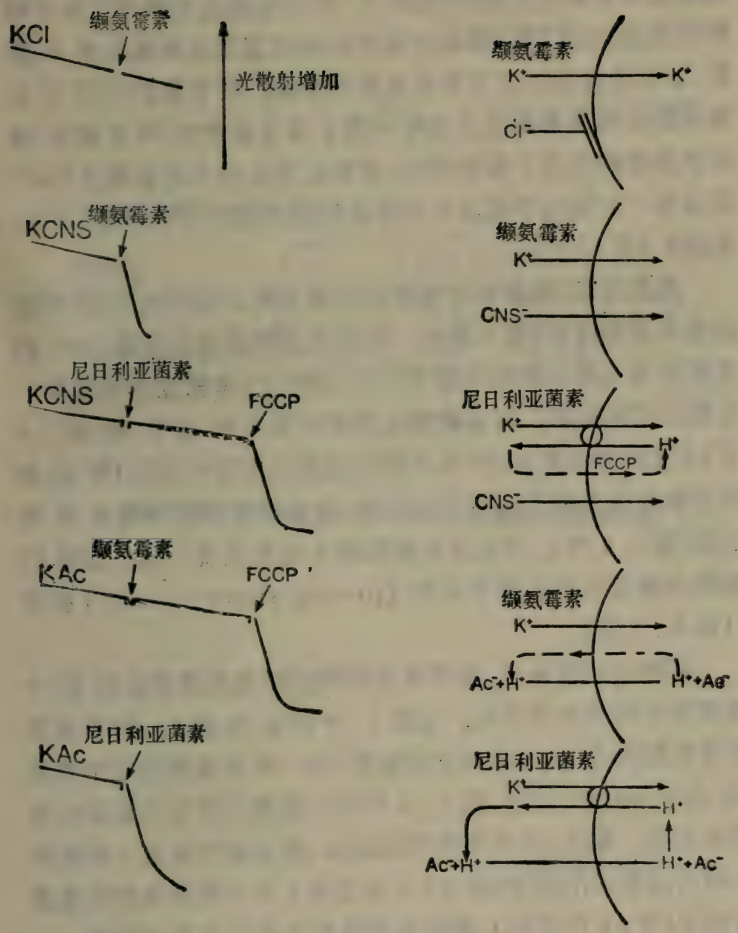


图2.7 非呼吸线粒体膨胀的状况

递（co-transported）质子在基质中的解离所产生的pH梯度(基质中呈酸性)抑制了醋酸的继续进入(见第 3.5 节)。使用缬氨霉素不会遇到这类问题。首先,阴、阳离子进入膜时都是呈电中性的;其次,质子与醋酸一起进入膜后又被离子载体缬氨霉素重新运出膜外,同时K^+作为交换进入膜内。由于同样的原因,在KCNS溶液中线粒体可以在加入缬氨霉素后膨胀,而不会在加入尼日利亚菌素后膨胀。所以我们不仅可以利用膨胀现象来确定究竟哪种离子是可通透的,而且可以确定该通透作用属于哪种类型。例如运用这种方法证明了Ca^{2+}是以单一运输的方式进入非呼吸线粒体的(Selwyn等,1970,见第8.4节)。

由此可知,膨胀作用需要两种离子均以相同的方式(带电的或者是中性的)进入膜内。但是当这种要求不能满足时,仍可通过加入质子移位体如 FCCP (图2.7)来诱发带电的单一运输而引起膨胀。氧化磷酸化作用的典型解偶联剂(第1.4节)在无呼吸线粒体中(即不存在假设的高能中间物)所起的作用恰如化学渗透假说所预示的,这是对该假说非常有利的证据(第1.4节)。利用这种膨胀技术首先发现了褐色脂肪线粒体内膜有天然的质子短路（proton short-circuit）存在（第4.5节)。

在呼吸线粒体中,必须考虑到被呼吸链跨膜泵出的质子对基质体积改变的影响。如图2.8所示,当存在一种可通透的带电阳离子(由于膜电位而积聚)和一种可通透的电中性弱酸(由于ΔpH而积聚,第2.5节)时,依赖于呼吸的膨胀作用就会发生。反之,在呼吸作用起始时,若基质中会有一种电中性的可通透的阳离子(被ΔpH所逐出)及一种带电的可通透阴离子(被$\Delta\psi$所逐出),预膨胀的线粒体就会迅速地收缩。

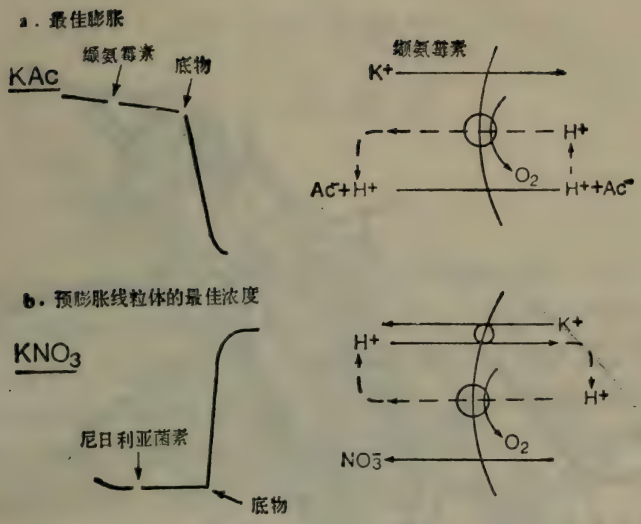


图 2.8　呼吸线粒体的最佳膨胀和最佳浓度的各自环境

ATH
AMP
GB TULP

3 定量生物力能学：驱动力的测量

3.1 引 言

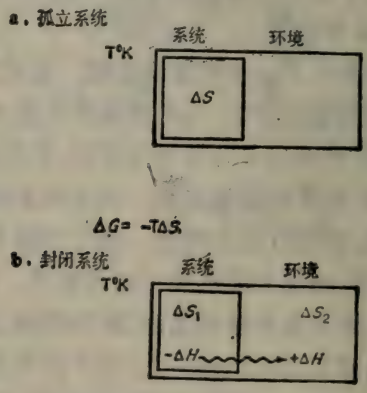
本章打算介绍热力学中与生物力能学有关的部分。由于大多数生物化学家（如作者本人）的物理化学基础都不够强，所以这是生物力能学中最容易被误解的方面。论题只限于与生物力能学有特殊关系者，同时我尽量使一些重要的关系不显得那么神秘，从那些我认为是普遍理解的起点来推导它们。读者假如仅是为了摆脱ATP是一个"高能"化合物的想法，最好能坚持看完推导过程。我已指出了一些用于参考的最基本的部分，都列在各节中了。

在热力学中研究了三种类型的系统：孤立系统（或称绝热系统），是完全独立存在的，与环境既无能量交换，也无物质交换；封闭系统，在物质上是自身含有的，但是能越过其边界（boundary）与环境进行能量交换；而开放系统则不仅可以与环境交换物质，还可以交换能量。热力学对于这三种体系在处理上的复杂性随其分离性变小而增加了。经典的平衡热力学用在开放系统中是不够精确的，因为跨越边界的物质流动妨碍了系统内部真正平衡的建立；由于所有生物力能学系统都是开放的，与环境始终不断地交换着底物和终产物，所以意识到在这一领域中应用平衡热力学的局限性是重要的。

然而，经典热力学仍可用于预示在复杂的能量转换作用中达到平衡态所需的条件，以及推导当反应从平衡态转移时

能量流动的方向。虽然热力学处理不能证明某种机制的存在，但是任何违背热力学定律的假设机制，都很易于为平衡热力学所否定。最后，在近平衡状态下，还可将平衡状态的参数代入不可逆热力学(它研究开放系统)方程式中以求得能量流动的速率。

在一个孤立系统中，反应的驱动力是熵，而且只有那些使系统的熵增加的反应才会自发发生。在一个封闭系统中，这种熵驱动力仍然存在，但必须将体系与环境二者的净熵变化一起考虑，以便预示其自发性。因为环境中的熵变化难于测定，所以净熵变化的计算必须纯粹依据系统中可测定的参数，即系统中的熵变化及越过系统边界的焓(热)流动(图3.1)。在孤立和封闭系统中，Gibbs能量变化，ΔG 是净驱动力定量的量度(在恒温、恒压时)，Gibbs能量减少($\Delta G<0$)的过程能使系统和周围的熵净增加，如果有一种机制参与，它能自发发生。



$$\text{若}\ \Delta S=\Delta S_1-\Delta S_2$$
$$\Delta G=-T\Delta S=T\Delta S_2-T\Delta S_1$$
$$\text{但是}\ \Delta S_2=\Delta H/T$$
$$\Delta G=\Delta H-T\Delta S_{净}$$

图 3.1 孤立系统与封闭系统中的Gibbs能量变化

Gibbs能量变化(也称作自由能变化)以四种不同的形式在生物力能学中出现；实际上这个问题或许可以更恰当地解释为对于Gibbs能量不同表现形式间互相转化的机制的研究。(1)Gibbs能量变化本身可用于描述进入呼吸链的底物反应以及最终的ATP合成。(2)发生于呼吸作用与光合成作用电子传递途径中的氧化还原反应，通常不是用Gibbs能量变化来定量表示，而是用由此推导出的氧化还原电位变化来定量的。(3)质子梯度中的有效能量是用Gibbs能量变化的进一步变形——质子电化学电位来定量的。(4)在光合体系中，吸收光量子所得有效的Gibbs能量可以直接与其他的Gibbs能量函数相比较。必须强调，这些不同的惯例只不过反映了各种事件的形形色色的历史背景，它们被化学渗透能量转换作用联系在一起了。

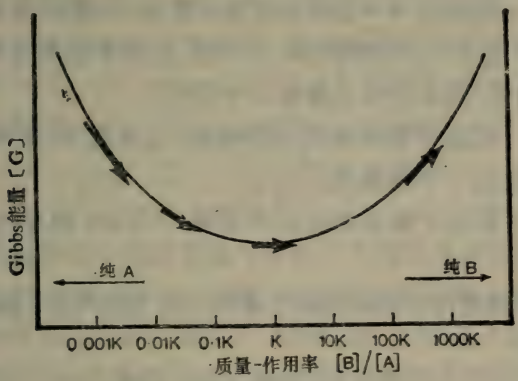


图 3.2 一个反应的Gibbs能量是从平衡点位移(displacement)的函数

一个封闭系统中含有组份A与B，其浓度分别为[A]和[B]。A与B可以通过反应A⇌B互相转化。当质量-作用率[B]/[A]＝K时，反应达到平衡。曲线定性地表明了当[A]＋[B]的总和为一个常数，而质量-作用离开平衡点变化时，这个体系的Gibbs能量(G)是如何变化的。箭头则用图示法表示了不同的质量作用率下发生的A向B的微小转化作用中的Gibbs能量变化($\triangle G$)。

3.2 Gibbs 能量

考虑一个简单反应 $A \rightleftharpoons B$，其特征平衡常数为 K。假若能确定Gibbs 能量 (G) 的绝对值是反应程度的函数的话，那么反应曲线就会如图 3.2 所示为一条抛物线。曲线具有如下特征：

(a) 当反应处于平衡时，Gibbs能量(G)的值最小。因而质量-作用率[B]/[A]的任何偏离平衡比例的变化都需要系统中Gibbs 能量值的增加；因而是不会自行发生的。

(b) 曲线在平衡点的斜率为零。这就是说，不引起Gibbs能量值很大变化，微量的A向B的转化作用只是稍稍改变了质量-作用率，即斜率ΔG(单位为kJ mol^{-1})在平衡点为零。

(c) 在反应 $A \rightarrow B$尚未达到平衡时，少量的 A 转化为 B 会引起 G 值下降，即斜率 ΔG 为负值，意味着假如这种反应机制存在的话，那么该转化能够自发发生。

(d) 接近平衡处曲线的斜率减小，这意味着 $|\Delta G|$ 越小，反应越趋于平衡状态。

(e) 超过平衡点的反应需要输入Gibbs 能量，故不能自发发生。

这个讨论可以加以归纳，并可以定量地考虑，就反应式3.1来说，

$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD \qquad (式3.1)$$

反应的平衡常数定义为：

$$K = \frac{[C]_{平衡}^{c} \cdot [D]_{平衡}^{d}}{[A]_{平衡}^{a} \cdot [B]_{平衡}^{b}} mol(c+d-a-b) \qquad (式3.2)$$

将各个组分于平衡态时的浓度代入方程式中，即可求出平衡质量-作用率。

假如反应在非平衡态进行，表观质量-作用率（observed mass-action ratio）定义为：

$$\Gamma=\frac{[C]^{c}_{表观}\cdot[D]^{d}_{表观}}{[A]^{a}_{表观}\cdot[B]^{b}_{表观}}\text{mol}(c+d-a-b)\quad(式3.3)$$

那么，当a mol的A与b mol的B转化为C与D，并且Γ无显著变化时，Gibbs能量变化可由下式得出：

$$\Delta G=-2.3RT\log_{10}K/\Gamma\qquad(式3.4)$$

（这里的因子2.3是从自然对数值得来的，R是气体常数，T是绝对温度）所以ΔG是（反应状态）从平衡态位移的函数，因子$2.3RT$表示在25℃下，保持以一个数量级大小离开平衡点的反应，其ΔG值为$5.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。假如表观质量-作用率低于平衡常数，这个Gibbs能量函数为负值，假如表观质量-作用率高于平衡常数，则这个Gibbs能量函数值为正值。

这个关系也可以参照ATP水解为ADP和Pi的反应来解释。在pH7.0及10mmol/L Mg^{2+}存在时，该反应的表观平衡常数K'约为10^5（Rosing与Slater，1972）：

$$K'=\frac{[\Sigma ADP][\Sigma Pi]}{[\Sigma ATP]}=10^5\qquad(式3.5)$$

这里各个组分的浓度值均为处于不同电离状态的该组分的浓度总和，包括与Mg^{2+}结合的在内（见后）。因为当Γ是10^5时可达到平衡，在10m mol/L Pi和10m mol/LADP存在下（这是细胞质中的典型情况），ATP的平衡态浓度仅为10^{-9}。

ΔG随质量-作用率从平衡点的移动而变化（见表3.1）。在培养液中线粒体能保持一个为10^{-5}mol/L的低质量-作用率，由平衡点移动10个数量级大小（Slater等，1973）。在这样的条件下，培养液可以含有10m mol/LPi，10m mol/LATP，而只有10^{-5}mol/LADP。从表3.1可以查出，如保持这种浓度，那

么线粒体每合成1molATP,就需要加入57kJ·mol^{-1}的Gibbs能量。记住,这种用于ATP合成的Gibbs能量变化是由相应量的ATP水解得来的,只要简单地变化一下符号就行了。

表3.1 ATP水解反应(ATP→ADP+Pi)的Gibbs能量变化是从平衡点位移的函数

假如K'(pH7, [Mg^{2+}] 10 m mol/L)=1.0×10^5

表观质量-作用率K'/Γ' (Γ')		ΔG (kJ mol^{-1})	[ATP] / [ADP] 当 [Pi] =10m mol/L
10^5	1	0	10^{-7}
10^3	10^2	-11.4	10^{-5}
10	10^4	-22.8	10^{-3}
1	10^5	-28.5	10^{-2}
0.1	10^6	-34.2	10^{-1}
10^{-3}	10^8	-45.6	10
10^{-5}	10^{10}	-57	10^3

详细数据见Rosing和Slater, 1972.

当反应的表观质量-作用率是单位值时,ΔG的一般方程式(式3.4)出现特例,这种条件被定义为标准Gibbs能量变化ΔG°,方程简化为:

$$\Delta G^\circ=-2.3RT\log10K \qquad (式3.6)$$

将这一关系代入式3.4,可消去平衡常数:

$$\Delta G=\Delta G^\circ+2.3RT\log10\Gamma \qquad (式3.7)$$

这就是Gibbs能量方程最常见的形式。注意,在这一处理中K和Γ是无量度的。

为了防止在平衡常数推导中的含混不清,对Gibbs能量变化作了一些规定。以下几项与生物力能学者关系最大:

(a)真正的热力学平衡常数是以化学活度来表达,而不是以反应物及产物的浓度来表达的。但是一般来说在生物化学

系统中不可能确定所有组份的活度，所以平衡常数由浓度求出。只要表观质量-作用率和平衡常数是在类似条件下求出来的，这种推导就没有错误。

(b)水无论作为反应物还是产物，它的浓度都被看作单位浓度，而不是55mol/L。这表示水可以从平衡及质量-作用方程式中略去。

(c)若一种或多种化合物或产物是可解离的，或是可与阳离子螯合的，那么，究竟平衡常数应根据处于不同形式的该化合物的浓度总和来求出呢，还是只根据确信参加了反应的那种化合物形式的浓度来计算，这里存在着含混不清之处。ATP水解成ADP和Pi是一个非常复杂的情况：不仅所有的反应物与产物在生理pH值下是离子化的，而且假如Mg^{2+}存在的话，也会与ATP和ADP以不同的亲和力螯合(见Chappell, 1977)。因此，在pH7时，ATP能以下述多种形式存在：

$$[\Sigma ATP]=[ATP^{4-}]+[ATP^{3-}]+[ATP\ Mg^{2-}]+ \\ +[ATP\ Mg^{-}] \qquad (式3.8)$$

如果已知真实的反应是：

$$ATP\ Mg^{2-}+H_2O=ADP\ Mg^{-}+Pi^{2-}+H^{+} \qquad (式3.9)$$

那么，真实平衡常数就是：

$$K=\frac{[ADP\ Mg^{-}][Pi^{2-}][H^{+}]}{[ATP\ Mg^{2-}]} \qquad (式3.10)$$

虽然pH或Mg^{2+}允许在方程中，但是平衡常数是与之无关的。然而反应种类(reacting species)肯定是未知的，尽管它们存在，但它们的浓度也很难确定，因为无论是酶学测定或是化学测定，所检测到的都是各种化合物的总浓度(即ΣATP)。

因而，在实际上所用的表观平衡常数K'是从每一种反应物及产物的总浓度计算得出的，不去考虑任何离子化作用或

螯合作用的影响(见式3.5)，特别是所涉及到的任何质子，在方程中都略去了(见式3,5)。

最重要的局限性是，对于一个在恒温下的特定反应，K'不是常量，它依赖于所有那些已从等式中略去的因子，如pH阳离子浓度。故一个表观平衡常数仅在特定的pH和离子浓度下才有效，而K'也必须为这些条件所限定。标准Gibbs能量变化是直接从平衡常数推导来的，当这个参数是从表观平衡常数得来时，它也同样要被限定($\Delta G^{\circ\prime}{}_{pH=x,[Mg^{2+}]=y}$)。

计算实际Gibbs能量变化，需要选择普通条件下的$\Delta G^{\circ\prime}$或K'，并且表观质量-作用率也由同样条件计算出来：

$$\Delta G' = \Delta G^{\circ\prime} + 2.3RT\log 10\Gamma' \qquad (式3.11)$$

人们经常假定ATP中的磷酸酯键是高能键，它能够贮存能量并能推动反应朝不利的方向进行，这很容易使人误解。表观质量-作用率从平衡点被移动的程度清楚地列在表3.1，它给出的是所有反应物作功的能力，而不是任何单一组份的贡献。设一个假设的细胞能够利用任何反应从线粒体转换能量，例如假设葡萄糖-6-磷酸酶反应能够保持十个数量级远离平衡点，那么，在细胞中葡萄糖-6-磷酸就完全能象ATP一样地作功。反之，即使处于平衡态的ATP、ADP与Pi的混合物充满了太平洋，这些ATP也不具有做功的能力。

另一个错误是将实际Gibbs能量变化与标准Gibbs能量变化混为一谈，这似乎还常能在印刷品中见到。标准Gibbs能量变化只是重新规定平衡常数(式3.6)，并不能给出有关细胞内条件的信息。线粒体中ATP合成的"效率"常由此而被错误地引用。

ATP合成酶反应的Gibbs能量有时被简称为"磷酸化势能"(phosphorylation potential)，"磷酸势"(phosphatle-potential)，或ΔG_p。为了便于从热力学角度将磷酸化势能

与氧化还原电位或质子电化学电位进行比较，ΔGp经常用mV作单位来表示(第3.8节)。

3.3 氧化还原电位

线粒体呼吸链和光合成电子传递链都如同一个反应系列，电子从其中的一个组分传向另一个组分。一些组分在从氧化态转变到还原态时，只是获得一个或几个电子；而另一些组分在获得电子后，导致其分子上一个或几个可解离基团的pk值增加，从而使还原作用伴随着获得一个或数个质子。

细胞色素c经历单电子还原作用：

Fe^{3+}—细胞色素c＋1 e^-＝Fe^{2+}—细胞色素c　(式3.12)

NAD^+经历双电子还原作用并得到一个H^+：

$$NAD^+ + 2e^- + H^+ = NADH \qquad (式3.13)$$

辅酶Q获得$2H^+$之后：经历双电子还原作用：

$$UQ + 2e^- + 2H^+ = UQH_2 \qquad (式3.14)$$

这最后一种情况常被说成是2H-转移，这是不准确的。

所有的氧化-还原反应都能用热力学术语通过它们的Gibbs能量变化来恰当地予以描述。然而，由于这些反应涉及电子传递，故常使用电化学参数。尽管如同在Gibbs能量变化中一样，热力学原理都是相同的，但是在电化学中氧化还原电位的起因有时搞混了这一关系。

对氧化还原反应进行电化学处理的另一有利之处是能够将整个电子转移反应分解成参与供给和接受电子的两个半反应。

例如由乳酸脱氢酶催化的反应：

丙酮酸＋NADH＋H^+ ⇌ 乳酸＋NAD^+　(式3.15)

可以看作是两个半反应：

$$NADH \rightleftharpoons NAD^+ + H^+ + 2e^- \quad (式3.16)$$

$$丙酮酸 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons 乳酸 \quad (式3.17)$$

象$NADH/NAD^+$这样成对的氧化、还原物，被称为氧化还原电偶(redox couple)。

由于乳酸脱氢酶催化的整个反应是可逆的，故每个半反应的本身也必须是可逆的，在理论上可以用平衡常数描述，但是电子在溶液中并非独立存在，所以如何处理它们就比较复杂了。在电化学中，研究金属(即还原态形式)与它的盐(即氧化态形式)溶液之间的平衡时，也碰到类似的问题。在这种情况下，(氧化还原)电偶给出电子的倾向可依据两个半电池形成的电池来定量计算。每个半电池含有一个金属电极与1 mol/L盐溶液相平衡。电流回路全靠一个既连接两种溶液又不使之混合的电桥来相连。通过具有高内阻的电位计即可测定电极间的电位差。为了便于比较不同的电极电位，常将它们表示为与一个标准电极对——标准氢电极$H_2 \rightleftharpoons 2H^+ + 2e^-$间的关系。

显然不可能有固体氢电极，而代之以在1个大气压下，表面为氢气泡所覆盖的铂电极。它的表面是精细分离的铂(铂黑)以增加表面积。将该电极浸在1mol/L H^+溶液中时，它的绝对电势被定义为0(25℃)。任何金属盐电偶的标准电极电位，都可以通过将该未知电偶与标准氢电极一起组成电池来测定，或者与一些电极电位恒定的二级标准电极组成电池来测定，则更为方便。

在生物化学氧化还原电偶的研究上采用了类似的处理方式，正如氢电极的情况一样，不可能制造一个没有还原组份的电极，故仍采用铂电极。但是它们与金属/盐和H_2/H^+电偶不同，其氧化和还原组份通常都可以是水溶液状态，并定义当氧化和还原组份均以单位活度(或者按浓度均为1 mol/L)存

在时即为标准条件，这与 Gibbs 能量变化的标准条件相类似。通过实验观察到的相对于氢电极的电位被称为标准氧化还原电位。

仅仅在几种与生物力能学有关的情况中，要将电偶的氧化和还原组份与铂电极充分而迅速地平衡，以测得稳定的电位。大多数情况下，能够与初级氧化还原电偶及铂电极二者作用的第二级氧化还原电偶常被加入作为氧化还原中间物。下面将要谈到，当两个氧化还原电偶具有相同的氧化还原电位时，它们达到平衡。只要初级电偶的浓度关系不被破坏，那么电极将指出初级电偶的电位。在研究定位于膜结构中的组分的氧化还原电位时，利用一个或数个中间电偶是特别重要的（第5.3节）。

正如 Gibbs 能量变化一样，氧化还原电位也是依赖于反应物和产物的相对浓度的。在 pH＝0 时，氧化还原电偶：

$$\text{氧化剂} + ne^- = \text{还原剂}$$

其氧化还原电位有如下关系：

$$E = E_0 + 2.3\frac{RT}{hF}\cdot\log_{10}\frac{[\text{氧化剂}]}{[\text{还原剂}]} \qquad (\text{式}3.18)$$

这里标准氧化还原电位 E_0 要求氧化剂与还原剂均为单位浓度。在很多情况下，氧化还原反应中有质子参与，此时产生的半反应为：

$$\text{氧化剂} + ne^- + mH^+ = \text{还原剂}$$

当 pH 不为 0 时，标准氧化还原电势会比 E_0 偏负值，每 pH 单位 $2.3RT/F\cdot(m/n)$mV。这相当于在 $m=n$ 时，为－60mV/pH；或 $m=1$ 而 $n=2$ 时，为－30mV。这种修正不适用于标准氢电极，它作为恒定的参照物。通常生物力能学的习惯是确定 pH＝7 时的氧化还原电位。在这一条件下的标准氧化还原电位常被称为中点氧化还原电位：$E_{m,7}$。注意，尽管氢电极

的 E_0 仍作为不变的参照物，但是 $H^+/\frac{1}{2}H_2$ 电偶的 $E_{m,7}$ 是 $\times(-60)=-420mV$。

为了能够得到 pH 不为 0 时的实际氧化还原电位，式 3.18 可以改写为：

$$E_{h\ (pH=x)}=E_{m\ (pH=x)}+2.3\frac{RT}{nF}\log\frac{[氧化剂]}{[还原剂]}\quad(式3.19)$$

由氧化态与还原态组分的比率所引起的 E_h 值的特异性变化如图 3.3 所示。

表 3.2 一些中点电位值

氧化剂 $+ne^-+mH^+ \rightleftharpoons$ 还原剂

	n	m	$E_{m,7}$ (mV)	pH增加 1 单位时，E_m 的变化(mV)
铁氧还蛋白 氧化/还原	1	0	−430	0
$H^+/\frac{1}{2}H_2$ (H_2 1大气压)	1	1	−420	−60
$NAD^+/NADH$	2	1	−320	−30
$NADP^+/NADPH$	2	1	−320	−30
甲基萘醌/还原甲基萘醌	2	2	− 74	−60
延胡索酸/琥珀酸	2	2	+ 30	−60
UQ/UQH_2	2	2	+ 40	−60
吩嗪硫酸甲酯	2	2	+ 80	−60
细胞色素 c^{3+}/细胞色素 c^{2+}	1	0	+220	0
$TMPD^+/TMPD$	1	0	+260	0
$Fe(CN)_6^{3-}/Fe(CN)_6^{4-}$	1	0	+430	0
Fe^{3+}/Fe^{2+}	1	0	+780	0
O_2/DH_2O[a]	4	4	+820	−60

a.1大气压 O_2 和55D（即纯净）水。

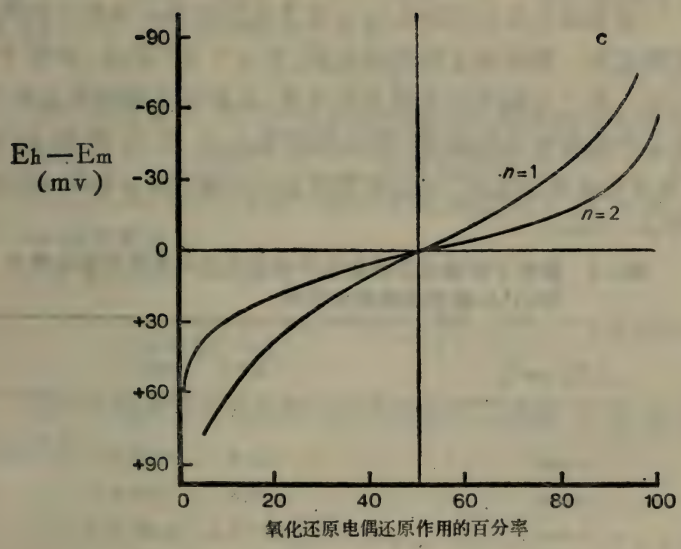


图3.3 E_n随着氧化还原电偶的还原程度而变化

氧化还原电位使得一个氧化还原反应中的两个氧化还原电偶都可以分别独立地加以讨论。但是，为了使这两个电偶间热力学不平衡性定量化，需要氧化还原电位差 ΔE_h 这个量。对于反应：

$$A_{还原态}+B_{氧化态}=A_{氧化态}+B_{还原态}$$

$$\Delta E_h=E_h(_A)-E_h(_B) \qquad (式3.20)$$

因为一个完整的氧化还原反应也能够通过Gibbs能量变化来描述，所以 ΔE_h 也可以用 $kJ\cdot mol^{-1}$（千焦耳·摩尔$^{-1}$）作单位。

$$\Delta G_0'=-nF\Delta E_h \qquad (式3.21)$$

F（法拉第）可用来将电学单位转变到 $kJ\cdot mol^{-1}$。从表3.3中可以清楚地看到，当$\Delta E_h=0$时，氧化还原反应处于平衡态。

最初提出氧化还原电位是为了研究在单一水相中的氧化还原反应，然而对于能量转换膜(第5.3节)来说，则要考虑三相：两个分隔开的水相及膜本身。假如存在跨膜电位的话，就会产生很复杂的情况，因为根据氧化还原电偶的定位，"电子的电化学电位"将包括膜电位的贡献(Mitchell,1976a；Walz,1979)。

表3.3 单电子转移反应及双电子转移反应的氧化还原电位差与Gibbs能量变化间的关系

$\triangle E_h$ (mV)	$\triangle G'$(kJ·mol^{-1}) $n=1$	$n=2$
0	0	0
+100	−9.6	−19.3
+200	−19.3	−38.6
+500	−48 2	−96.5
+1000	−96.5	−193
+1200	−116	−231

3.4 离子电化学电位差

Gibbs能量变化在生物力能学中的第三个表现形式是势能，这种势能为跨膜离子梯度，尤其是跨越能量转换膜的质子梯度所固有。有两种力作用于跨越带电荷的膜的离子梯度。一种是由离子的浓度梯度产生的。在没有电位影响时，将1 mol的溶质从浓度[X]′转移到浓度[X]″，其Gibbs能量变化是：

$$\triangle G=2.3RT\log_{10}\frac{[X]''}{[X]'} \qquad (式3.22)$$

注意这一方程式与标量反应方程式(式3.4)十分相似。对于每偏离平衡点10倍的移动，Gibbs能量变化是5.7kJ·mol^{-1}。

第二种特殊情况是，在没有浓度差时离子被转移到低电

位差状态。在这种情况下，1 mol 的离子 X^{m+} 被运输到电位低 $\Delta\psi$mV处，其Gibbs能量变化为：

$$\Delta G=-mF\Delta\psi \qquad (式3.23)$$

在一般情况下，离子会受浓度梯度和电位差的双重影响当 1 mol 的 X^{m+} 从浓度 $[X^{m+}]'$ 处运输到浓度 $[X^{m+}]''$ 处，这时电位降为 $\Delta\psi$mV，根据一般电化学方程，可以推导出净 Gibbs 能量变化是：

$$\Delta G=-mF\Delta\psi+2.3RT\ \log_{10}\frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]''} \qquad (式3.24)$$

Gibbs 能量变化通常按电位的单位表示成离子电化学电位梯度 $\Delta\mu_{Xm+}$

$$\Delta\tilde{\mu}_{xm+}=m\Delta\psi-\frac{2.3RT}{F}\log_{10}\frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'} \qquad (式3.25)$$

在质子梯度的特例中，log 因子被简化成 pH 之差 (ΔpH)，所以

$$\Delta\tilde{\mu}_{H+}=\Delta\psi-\frac{2.3RT}{F}\Delta pH \qquad (式3.26)$$

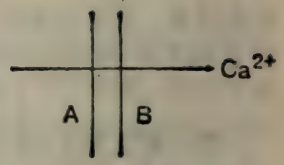
或者以mV为单位，在30℃时：

$$\Delta\tilde{\mu}_{H+}=\Delta\psi-60\Delta pH \qquad (式3.27)$$

式3.25是最常见的计算离子电化学梯度的公式，但只有当离子是通过带电单一运输(第2.3节)跨越膜时才适用。当两个或多个离子的运动直接相关时，就必须考虑全过程的电化学电位梯度。以图 3.4 为例，考虑了 Ca^{2+}离子运输的三种可能模式的电化学电位方程。

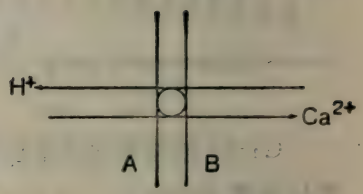
a. 单一运输，例如

$$\Delta\tilde{\mu}_{Ca^{2+}}=2\Delta\Psi-60\log_{10}\frac{[Ca^{2+}]_B}{[Ca^{2+}]_A}$$



b. Ca^{2+}/H^+ 互逆运输，例如

$$\Delta\tilde{\mu}'_{Ca^{2+}}=\Delta\Psi-60\log_{10}\frac{[Ca^{2+}]_B[H^+]_A}{[Ca^{2+}]_A[H^+]_B}$$



c. $Ca^{2+}/2H^+$ 互逆运输，例如

$$\Delta\tilde{\mu}''_{Ca^{2+}}=-60\log_{10}\frac{[Ca^{2+}]_B[H^+]_A^2}{[Ca^{2+}]_A[H^+]_B^2}$$

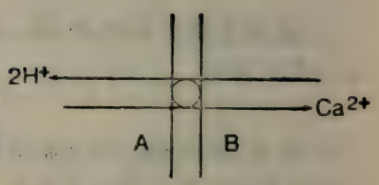


图3.4 Ca^{2+}离子以不同模式运输的电化学电位方程

3.5 离子、弱酸与弱碱的均衡分布

当 ΔG为0，即$\Delta\bar{\mu}_{x^{m+}}=0$时，跨膜离子分布(ion distribution)处于平衡态。此种条件下的电化学方程式为：

$$\Delta\bar{\mu}_{x^{m+}}=0=m\Delta\psi-2.3\frac{RT}{F}\log_{10}\frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'}\quad(式3.28)$$

变换后即得出 Nernst 方程：

$$\Delta\psi = 2.3\frac{RT}{F}\log_{10}\frac{[X^{m+}]''}{[X^{m+}]'} \qquad (式3.29)$$

所以，一种离子可以达到跨膜电化学平衡而无须使其在膜两侧的浓度均等。反之，尽管（膜两侧的）质子处于电化学平衡态，亦可能有跨膜电位存在。

对于任何一个特定的膜来说，膜电位都是一个不受部位限制的参量。所以，由于一种离子移位而产生的膜电位将影响分布在膜两侧的所有离子的电化学平衡。例如由于质子移位而产生的膜电位就可以通过第二种离子来检测。假如这第二种离子只能以简单的带电单一运输的方式通过膜，那么它将会重新分布，直至平衡得以恢复。由此形成的离子分布状态使膜电位可由式3.29求出。这是测定大多数能量转换细胞器$\Delta\psi$值的原理（见第4.2节）。图3.5说明，平衡离子分布是随$\Delta\psi$而变化的。

一个电中性可渗透物质不受$\Delta\psi$影响，当它的浓度梯度为零时就处于平衡。弱酸和弱碱（即pK'在3—11之间）经常以不

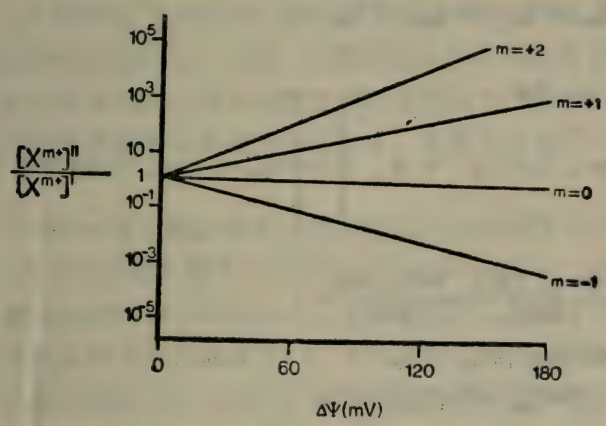
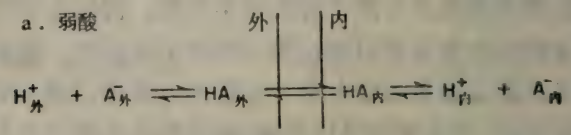


图3.5 能通过单一运输透过膜的离子X^{m+}的平衡分布是膜电位以及该离子所带电荷的函数

带电荷形式渗透跨过膜，而离子形式物质，尽管远比中性物质的量大得多，也仍是不渗透。如 pH 梯度跨膜存在，那Henderson-Hasselbalch 方程要求离子化物质的浓度必须不同，而跨越膜的不带电荷物质的浓度是相同的。

总之，弱酸阴离子会在酸性部分趋于高浓度，而质子化的碱则在碱性部分集聚。这一原理在测定跨越能量转换膜的ΔpH值时被广泛地运用(见第4.2节)。

a．弱酸



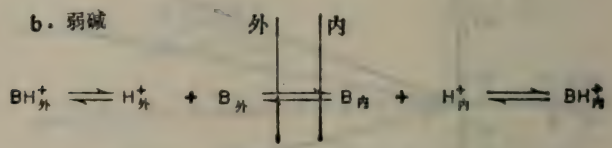
如果两部分里酸的pK值是相同的：

$$K=\frac{[H^+]_{外}\ [A^-]_{外}}{[HA]_{外}}=\frac{[H^+]_{内}\ [A^-]_{内}}{[HA]_{内}}$$

在平衡时，$[HA]_{外}=[HA]_{内}$

$\therefore [H^+]_{内}/[H^+]_{外}=[A^-]_{外}/[A^-]_{内}$

b．弱碱



$$K=\frac{[H^+]_{外}\ [B]_{外}}{[BH^+]_{外}}=\frac{[H^+]_{内}\ [B]_{内}}{[BH^+]_{内}}$$

在平衡时，$[B]_{外}=[B]_{内}$

$\therefore [H^+]_{内}/[H^+]_{外}=[BH^+]_{内}/[BH^+]_{外}$

图3.6　电中性膜可通透弱酸与弱碱的平衡分布是△ H的函数

3.6 膜电位、扩散电位、Donnan 电位及表面电位

总相膜电位 (bulk-phase membrane potential) (即跨膜电位差)可以由三种方式产生。第一种,是通过调控一种电致离子泵 (electrogenic ion pump),就象在能量转换膜中那样。第二种是通过在膜的一侧加入盐,盐所产生的阴、阳离子(对膜的)通透性不同,通透性高的就会先于其抗衡离子(counter-ion)扩散过膜,从而产生扩散电位。能量转换膜可能会产生扩散电位,例如在缬氨霉素存在下加入 K^+ 离子(见图4.7)。在真核细胞质膜中,由于通常运输过程较慢,故能在数小时内维持一定的扩散电位,与之相比在能量转换细胞器中,扩散电位由于平衡离子的运动则常是瞬变的。

有时若平衡离子是完全不通透的,扩散电位会出现少有的特例。在能量转化细胞器中由于内部蛋白(internal proteins)及磷脂的"被固定的"负电荷("fixed" negative charges)会导致这种情况。结果,当细胞器被悬浮在低离子强度介质中时较活动的阳离子就倾向离开该细胞器,直到诱发的电位与阳离子浓度梯度达到平衡为止,这就是静态 Donnan 电位。

Donnan 电位和扩散电位是两种可以被多种技术检测出来的、真实存在的总相电位(bulk-phase potential)。但是必须注意,这里的 $\Delta\psi$ 仅仅是 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 中的一部分。对这个问题的忽视曾在某些方面造成混淆(见Tedeschi,1979)。因此,悬浮在含有缬氨霉素(第2.5节)与FCCP(第2.5节)的蔗糖液中的线粒体,由于基质中补偿 pH 梯度(compensating pH gradient),即酸的影响,尽管 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 为零,仍保持静态 Donnan

$\Delta\psi$在80mV以上(Nicholls,1974)。当存在底物而没有FCCP时,$\Delta\psi$只是有限地增加到150mV,而$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$却从零增至230mV。因此,关于$\Delta\psi$依赖于代谢的程度的讨论(Tedeschi,1979)与化学渗透假说无关。反之,一种依赖于代谢的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$是否存在的问题则是很关键的。

表面电位(surface Potential)与上述二者大不相同。由于能量转换膜的表面存在被固定的负电荷,所以在近膜区域里质子的浓度高于本体溶液(图3.7)。但是$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$并不受影响,因为增加的质子浓度被降低的电位所平衡了。故尽管膜结合的$\Delta\psi$指示剂(如光合膜的类胡萝卜素)会因表面电位的存在而受影响(第6.3节),而这种跨膜的质子电化学电位差$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$却并不被它所影响。

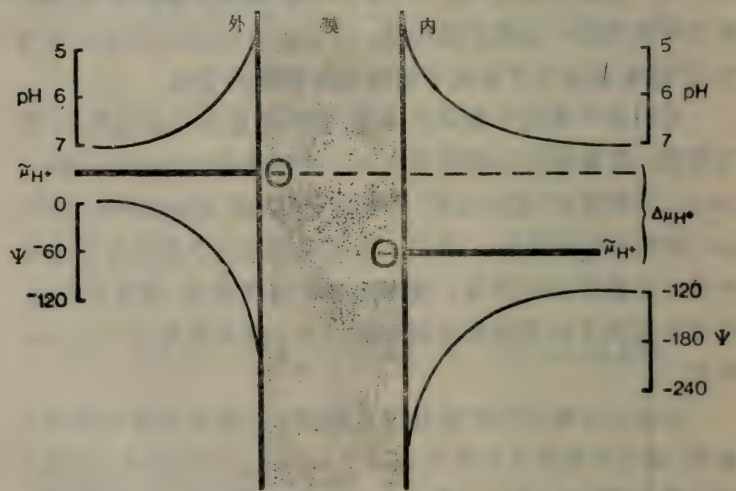


图3.7 在近膜区域里表面电荷对膜电位、△pH及$\Delta\mu H^+$的特性的影响

注意,尽管$\Delta\Psi$与△pH都是在靠近膜处发生变化,质子电化学电位并不被表面电荷所影响。这表明即使是靠近或结合在膜表面的质子也是与本体溶液处于化学平衡之中的。

3.7 光 子

在光合体系中，Gibbs 能量的最初来源是电磁能的量子或光子(它能为光合色素所吸收)。单个光子所具有的能量被定义为$h\nu$，这里的h是普朗克(Planck)常数(6.62×10^{-34}J·sec)，ν是辐射频率(s^{-1})。1个光子可与1个分子作用，所以N个[N为阿伏伽德罗(Avogadro)常数]光子将与1 mol的分子相作用。1 mol光子的能量为：

$$E=Nh\nu=Nhc/\lambda=120,000/\lambda \text{kJ爱因斯坦}^{-1} \quad (式3.30)$$

这里c是光速，λ是以nm作单位的波长。如在图3.8中可看到的，甚至吸收1 mol的红光(600nm)都可以做200kJ·mol^{-1}的功，这与在生物力能学中遇到的 Gibbs 能量变化很相似。

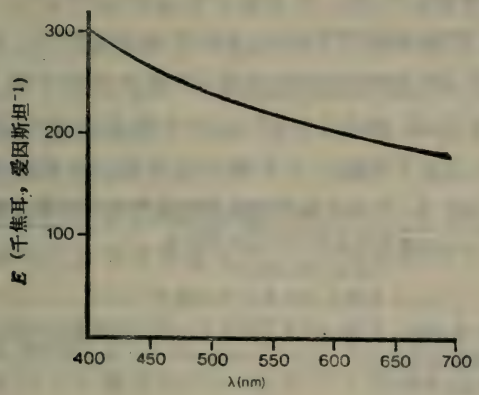


图3.8 1 Einstein光子所具有的能量是波长的函数

3.8 生物能量的互相转化

Gibbs 能量在前面的章节中所讨论过的那些不同形式间

的互相转化是化学渗透能量转换的关键步骤。一些较为重要的转换作用都总结在表3.4中了。平衡热力学可以回答下述问题：(i)某转换作用是否处于平衡($\Delta G=0$)？(ii)转换作用会朝什么方向进行？(iii)某转换作用的化学定量是什么(当达到平衡时，可算出$\Delta G=0$)。此外，平衡热力学参数在不可逆热力学形式中的适用性是有限的(这将在第3.9节中谈到)，因为近平衡过程能通量(energy flux)的速率是一种由平衡态值计算出来的热力学非平衡态函数。

为了计算一个特定的互相转化作用中的全部Gibbs能量变化，必须将各个组份都用相同的单位来表示。Gibbs能量变化是最基本的单位(用$kJ\cdot mol^{-1}$)，而氧化还原电位和电化学电位梯度多用电位单位。因此常通过除以法拉第常数(Faraday constant，F)将非氧化还原反应的Gibbs能量变化换算成电学单位：

$$\Delta G/F=\Delta G^{\circ\prime}/F+2.3RT/F\cdot\log_{10}\Gamma' \qquad (式3.31)$$

因此，假如一个反应的表观质量-作用率离开平衡点一个数量级大小(式3.4)，那么$5.7kJ\cdot mol^{-1}$的自由能变化即相当于59mV。在表3.4中规定了几种转换作用的平衡条件。

表3.4 几种化学渗透能量转换作用的平衡条件

(a)由氧化还原作用驱动的质子泵

$$2\Delta E_h=n\Delta\mu_{H^+}$$

这里的n是所考虑的氧化还原量距(redox span)$H^+/2e^-$的化学定量。注意，只有当限定这一氧化还原量距的两个氧化还原电偶都位于同一区间(compartment)时，该方程才有效(Walz，1979)。

(b)ATP合成酶

$$\Delta Gp(内)=n'\Delta\mu_{H^+}$$

$$\Delta Gp(外)=(n'+1)\Delta\mu_{H^+}$$

这里的n'是H^+/ATP的化学定量关系，ΔGp(内)指线粒体基质中的磷酸化电位，而ΔGp(外)则是指在线粒外的磷酸化电位。对腺苷酸和无机磷(Pi)跨越线粒体内膜的运输造成了它们之间的差别(第7.6节)。

生物力能学系统在活体内是开放的，但是用分离出的细胞器就常可能由于简单地抑制了随后的反应步骤而使互变作用达到真实平衡。例如，经分离得到的线粒体因为没有任何线粒体外ATP酶活性，故能在$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$和ATP/ADP+Pi反应间达到平衡。在这种条件下可以计算热力学定义下的化学定量关系(第4.4节)。

3.9 不可逆热力学的应用

综述Rottenberg,1979b；Westerhoff与van Dam,1979

经典平衡热力学可以预示某一能量转换步骤达到平衡的条件，进而预示平衡被打破后该过程可能进行的方向，但是却不能预示进行的速率。非平衡热力学(或称不可逆热力学)局限性较小。它可以将净能量转换速率与热力学非平衡态联系起来。此外，还可用于建立一组方程式来推导流量、电位以及电子传递、质子移位与ATP合成的相互作用。电子在电路中的流量可由同样方法推导出来，这就是为什么质子循环具有电学相似性的缘故(但只限于单一方向的质子流)。

对不可逆热力学形成的讨论已超出了本书的范围，但无论如何懂得这个领域是重要的，它的许多处理方法将会用到。

在近平衡条件下，通过一个生物力能学过程的净流量J是亲合力A或Gibbs能量差的函数。在近平衡条件下，流量与亲合性通过系数L线性相关，即

$$J=L\cdot A$$

在一个离子经简单的单一运输机制被跨膜运输的情况下，亲合性与电化学电位差(用与亲合性相同的单位表示)相等：

$$J=L\cdot\Delta\tilde{\mu}$$

例如由质子移位体催化的渗漏中：

$$J_{H^+}=L_{H^+}\cdot\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$$

即质子渗漏的量一定与 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 是线性相关的。在渗透过程中，在远离平衡的情况下该方程仍然有效，但是对化学反应则不适用。

对于紧密偶联的双离子跨膜同向运输：

$$J_B^A=L(\Delta\tilde{\mu}_A+\Delta\tilde{\mu}_B)$$

例如对于由大肠杆菌乳糖通透酶催化下的质子：乳糖同向运输（第8.5节）：

$$J_{乳糖}^{H^+}=L(\Delta\tilde{\mu}_{乳糖}+\Delta\tilde{\mu}_{H^+})$$

这意味着只要 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 是充分的，那么乳糖可以逆着自身的电化学电位梯度被运输。

对于化学计量为 n 的离子泵，如 ATP 合成酶，离子和化学流量是相关的，因而：

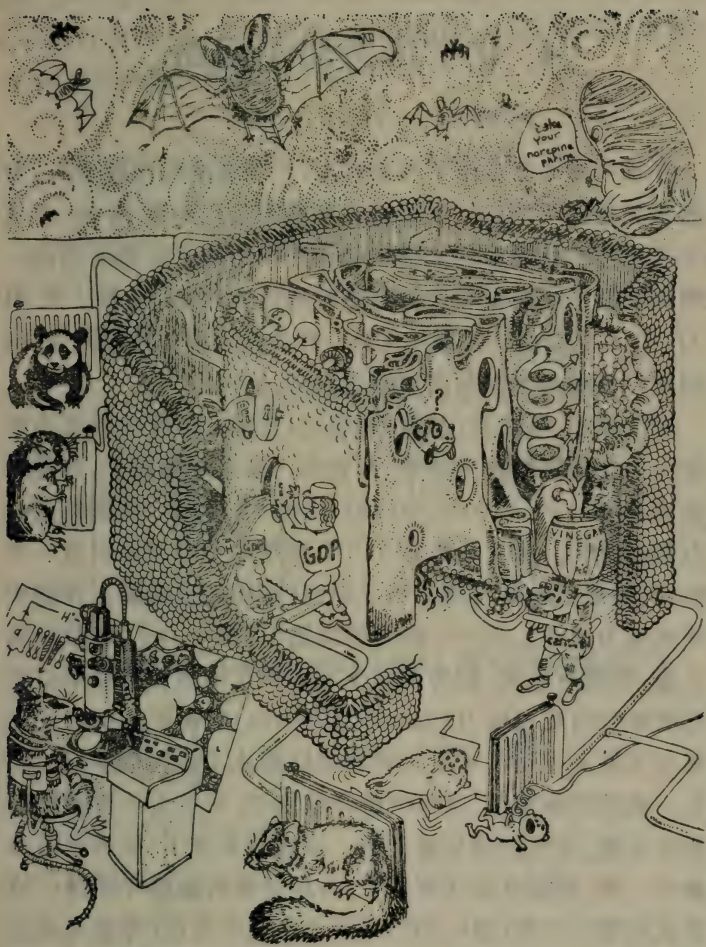
$$J_{ATP}=L_{ATP}(A_{ATP}+n\Delta\tilde{\mu}_{H^+})$$

$$J_H=n\cdot J_{ATP}$$

换言之，通过离子泵的净能量转换率是与全部热力学非平衡态成比例的。

线粒体具有可归属于呼吸链、ATP 合成酶及膜质子渗漏电导性的质子流量，它如同沿呼吸链流动的电子流量及 ATP 合成的流量一样，能够用同样的方程式来描述。每种流量相应于一定比例常数的产物及该步骤的 Gibbs 能量差。

这些方程式最重要的应用是推导有外部渗漏发生（这几乎是不可避免的）的实验中，质子移位与 ATP 合成的真实化学计量关系（见 van Dam 等，1980）。



褐色脂肪组织(BAT)线粒体的质子回路有一个能被核苷酸(如GDP)堵住的漏洞。这是使脂肪酸被氧化成醋酸而产生热的生热机制的一部分。Cl^-的可渗透性仍是一个疑问(第4.5节)

4 化学渗透质子回路

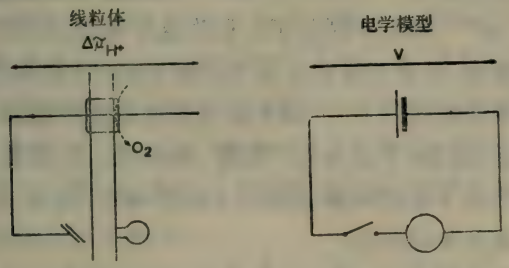
4.1 引　　言

在第一章中曾介绍了与带有ATP合成酶的初级$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$发生器相关的质子回路。本章讨论那些在较广的范围内、在体外亦可发生的化学渗透能量转换作用中的质子回路的功能。也将阐述质子回路及相应的电回路间极大的相似性(见图1.3)，这不仅是由于模型的简化，而且也是由于在两种回路中的能量流动都遵循相同的规律(第3.9节)。

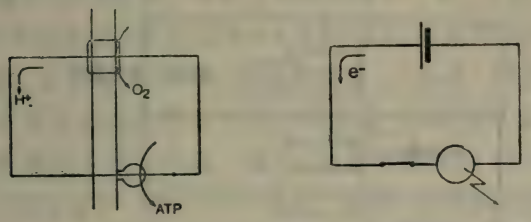
在电路中，电位差(伏特)和电流(安培)是两个最基本的参数。为了测定这两个功能，要导出一些其他的因子，如能量传送率(rate of energy transmission，瓦特)或回路组份的电阻(欧姆)。图4.1表示了一个简单的电学回路以及一个类似的、跨越线粒体内膜的质子回路(跨越光合成膜工作的质子回路更为类似)。在一个断开的回路中(图4.1a)，电位达到最大值，但没有电流，因为由这个电池产生的氧化还原电位差恰好被电位的反向压力(back-pressure)平衡了。在电池中的氧化还原反应与电子流的紧密偶联阻止了任何化学反应的发生。就线粒体来说，当呼吸链释放出的质子无法重新回到基质中去时，质子回路是断开的。在这种条件下，如同在电学回路中一样，跨膜电位达到最大，跨越能量转换膜呼吸链区域的氧化还原电位差(第5.3节)与质子电化学电位(考虑到转换作用的$H^{\bullet}/e^{-}$化学计量关系，见第3.8节)处于平衡。因为氧化反应是与质子的释放紧密偶联的，所以在这种条件下不存在呼吸作用。

在图4.1b中，电学回路和质子回路都在正常运转并在做

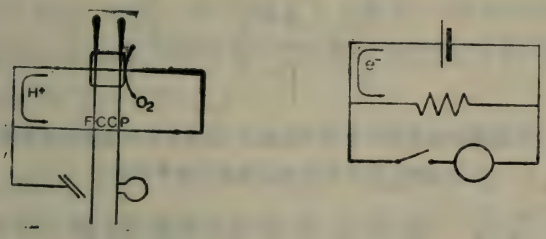
有用功。其电位较断流条件下稍小，因为使电池和呼吸链得以运转的净驱动力乃是有效的氧化还原电位差与回路电位间微小的不平衡状态。电池的“内阻”可以从用于维持一定电流的电位降计算出来。相似得很，呼吸链的“内阻”也可以推测出来，而且发现它很低(第4.5节)。



a. 断路，电流为零(无呼吸作用)。电势($\Delta\mu_{H^+}$)最大



b. 电路接通。电流流动(呼吸作用发生)。做有用功(合成ATP)



c. 诱发短路，耗散能量，电势低，电流(呼吸作用)高

图4.1 线粒体质子回路与电路相类似

通过向电路中引入一条与原回路并联的低阻抗通路即会形成短路(图4.1c)。现在电流可以流出电池而不做任何有用

功，能量以热的形式被消耗着。在质子回路中通过加入质子移位体（第2.4节）可以实现回路的解偶联，使呼吸作用发生，却没有相应化学计量的ATP合成。

把呼吸链看成一个简单的“质子”发生器（generator of “proticity”）是过于简化了。因为这个链是由三个运转的质子泵所组成，从质子回路上看它们是并联的，从电子流上看它们又是串联的（图4.2）。第5章将对呼吸链作详细讨论，在这里只是把它们简单地作为“黑箱”来处理。应注意，电子是可以从各个质子泵的间隙处被引入或移出的，故各质子泵都可以被分离并加以研究。

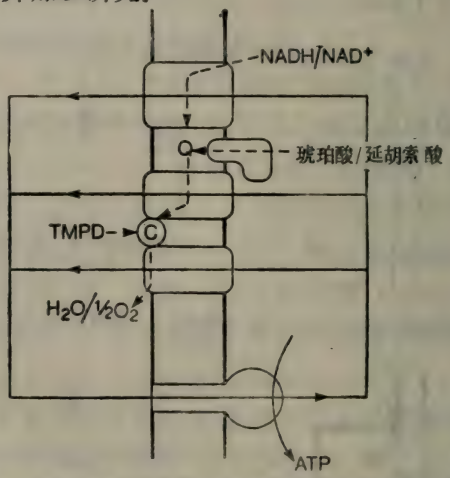


图 4.2 线粒体呼吸链由三个质子泵组成，从质子回路上看这些泵是并联的，而从电子流上看它们则是串联的

4.2 质子电化学电位的测量

综述 Kottenberg，1975，1979a；Fillingame 1980

质子电化学电位的定量测定对化学渗透理论来说相当重要，因为在没有足够的$\Delta\mu_{H^+}$的情况下单纯论证净ATP合成，

是肯定要毁掉整个大厦的。质子电化学电位也是能量转化细胞器中存在的"能化"状态的最直接的和定量的指示剂。

$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$检测技术包括分别测定 $\Delta\psi$和 ΔpH（第 3.5 节）。$\Delta\psi$可以直接测定，即根据平衡状态下某种可经带电单一运输透过膜的离子的浓度梯度差（第 2.3 节），应用 Nernst 方程（式3.30）计算得出；或者利用某种离子梯度所产生的扩散电位（diffusion potential，第3.6节）去标定$\Delta\psi$的光谱学指示物来测定。ΔpH一般是从电中性渗透的弱酸和弱碱（第 3.5 节）的平衡分布计算得来的。

必须十分谨慎地选择适宜的指示剂，为了测定$\Delta\psi$，首先，积聚的离子必须带有恰当的电荷[相对于介质来说，假如内部为负（如线粒体）则用阳离子；内部为正（如超声得到的亚线粒体颗粒、载色体、叶绿体）则用阴离子]。其次，应选择不结合的或者其活性系数容易算出的指示剂，以便有可能计算细胞器内游离指示剂的浓度。第三，该指示剂必须已达电化学平衡，并且只能以一种机制被运输。第四，指示剂对梯度的影响应该尽可能地小。第五，指示剂是不能被代谢掉的。

为了测定ΔpH，一定要满足上述条件。但是当细胞器内部显碱性时可积累弱酸作指示剂，而内部呈酸性时可积累弱碱作指示剂（第3.5节）。

一种指示剂一旦达到了平衡分布就肯定能测出。这可以通过从培养介质中迅速分离细胞器，通过持续监测指示剂的浓度在培养中因离子积聚而降低，或利用指示剂在细胞器内积聚时，光谱特性的变化等来实现。下面将谈到这些技术的例子。

---

*原文为 ion-specific electrode，但以称为离子选择性电极为好，详见B.L. Williams与K.Wilson合著的《实用生物化学原理与技术》一书，科学出版社，1979，北京。

4.2.1 用离子选择性电极：测定$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$

综述 Rotterberg, 1975, 1979a; Skulachev, 1979

首次测定线粒体中的$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$（Mitchell和Moyle, 1969a）是用pH电极和K^+离子选择性电极在无氧的线粒体培养液中进行的(图4.3)。加入缬氨霉素可以引起高度K^+离子带电单一运输，从加入一定量O_2造成的K^+离子吸收即能计算出$\Delta\psi$值，根据平行的H^+排出量可推算出ΔpH。在"断路"条件下呼吸无ATP合成时，可测得$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$为288mV（表4.1中的状态4）。

表4.1 呼 吸 状 态[a]

				呼吸作用
状态1	线粒体	无底物	无ADP	低
状态2	线粒体	无底物	ADP	低
状态3	线粒体	底物	ADP	高
状态4	线粒体	底物	ADP耗尽	低
状态5	线粒体	底物	O_2 耗尽	

状态3还可以再细分：

状态3_{unc}：通过加入质子移位体获得高呼吸作用

状态3_{ADP}：通过加入ADP获得高呼吸作用

状态$3\frac{1}{2}$：中间状态，以有限速率(生理速率)加入ADP

状态6 是指在无可渗透的阴离子存在，而Ca^{2+}的积累建立了高△PH的情况下，有时可以观察到的被抑制的呼吸作用

a. 对呼吸状态的最初分类(Chance 和 Williams, 1956)。

Skulachev 实验室建立了一种很接近的测定不同的能量转换细胞器$\Delta\psi$值的方法。代替K^+离子和缬氨霉素，使用了一系列人工合成的阳离子与阴离子，它们的电荷完全离位，而且被疏水基团所屏蔽，使得这些带电的离子能够透过双分子层区(第2.5节)。在最初的方法里，培养介质中离子被细胞

器吸收而引起浓度的下降，是借助片层状黑脂膜（第1.3节）隔开的也含有这类“Skulachev”阳离子的第二空间来测定的。该合成膜两侧的离子浓度之差所引起的膜电位可以由一些电极检测出来，它们是离子选择性电极。这种技术无需使用K^+离子和缬氨霉素，故当使用一种在基质中的浓度已达100m mol/L的离子时（见后），就减少了对其已有的$\Delta\psi$的“钳制”，并引起化学中间物阳离子泵的崩溃（第1.4节）。

目前这类离子中有些已有用放射性同位素标记的，可用于$\Delta\psi$的同位素测定。

4.2.2 由同位素分布推算$\Delta\psi$和ΔpH

综述 Nicholls, 1974; Rottenberg, 1975, 1979; Ramos等，1979

利用流动透析技术（图4.4），根据放射性同位素的平衡分布来测定$\Delta\psi$和ΔpH是可行的，这样就不必从培养介质中分离细胞器了。培养液中指示剂的浓度可由它通过半透膜进入介质稳流中的速率来连续监测。但是由于不需要将细胞器分离出来，这种方法与前面谈到的电极技术在灵敏度上都有局限性。在大多数培养液中，内部空间的体积要比培养液的体积小三个数量级，所以直接测定内部空间离子浓度增加的方法尽管需要进行分离，要比测定外部离子浓度下降灵敏得多。

一种有效的分离技术必须十分迅速，以防止人为造成指示剂的重新分布。而且必须提供一种手段来测定培养介质中的残余污染。硅酮油离心（图4.5）和微孔过滤是两种已被普遍应用的技术，它们各有优点。硅酮油离心法准确（由于培养介质污染少），但是耗费时间。微孔过滤法准确性稍差（由于滤膜承受量有限而外部体积大），但是十分迅速和简便。无论

用哪种方法，都需要有第二种同位素作为外部标记物，以便对外部污染做定量计算。表4.2列出了用来检测Δψ和ΔpH的几种同位素化合物。

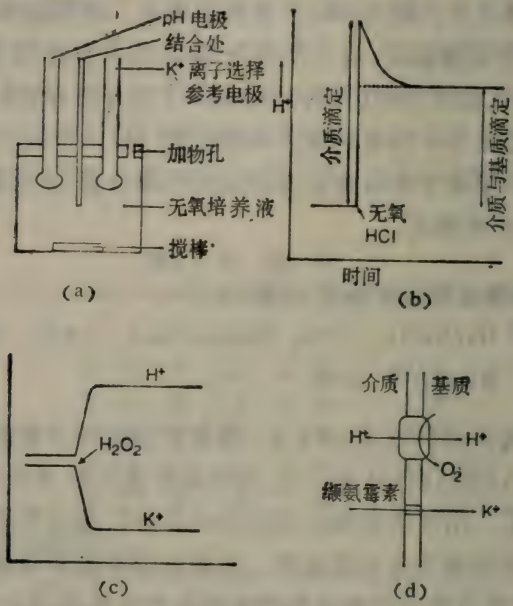


图4.3 用离子选择性电极测量△ψ和△PH

(a)仪器 (b)测定基质缓冲能力 (c)实验 (d)离子的运动

线粒体于含有蔗糖、底物、缬氨霉素和低浓度K^+离子的无氧介质中保温培养。加入足够量的H_2O_2，使呼吸链作用达3分钟(保温介质中含有过氧化氢酶)，质子被排出(由pH电极测出)，K^+离子被吸收(由K^+离子选择性电极测出)。在缬氨霉素存在下，K^+离子的分布符合Nernst方程。知道了积聚K^+离子的基质的体积，就可以从外部K^+离子的减少计算出K^+离子梯度。

从外部PH的降低来计算△PH，需要基质中由于失去质子而升高的PH值。这又需要知道基质的缓冲能力。这是从独立的在无氧介质中加入HCl的实验中得到的。最初的酸化作用可用来测定介质的缓冲能力；接着，由于质子进入基质而有一部分衰减；最终状态则反映了介质＋基质的缓冲能力。

表 4.2 某些跨越能量转换膜的质子电化学电位的值

材料	条件	方法	$\triangle\psi$	$-60\triangle pH$	$\triangle\mu_{H^+}$	参考文献
肝线粒体	状态 4	离子选择性电极	168	48	216	Mitchell和Moyle, 1969
褐色脂肪线粒体	质子通道开启	$^{86}Rb_+$, ^{14}C-甲胺, ^3H-醋酸盐同位素分布法(过滤)	79	−25	54	Nicholls, 1979
	质子通道被抑制		134	+95	229	
心肌亚线粒体颗粒	NADH底物	$S^{14}CN$和^{14}C-甲胺的同位素分布(流动透析法)	145	0	145	Sorgato等, 1978
大肠杆菌细胞	呼吸	四苯基磷吸收($\triangle\psi$)和DMO($\triangle pH$)(流动透析法)	100	+105	205	Zilberstein等, 1979
叶绿体	光	9-氨基吖啶荧光淬灭测$\triangle PH$, $\triangle\psi$为0	0	180	180	Rottenberg等, 1972
载色体	黑暗	^{14}CNS和^{14}C-甲胺的同位素分布(精蛋白硫酸盐集聚后离心)	12	65	78	Schuldiner等, 1974
	光照		89	106	195	

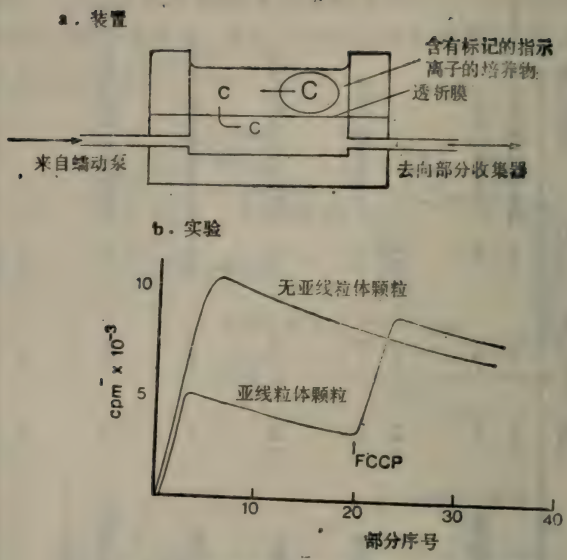


图4.4 用流动透析法测定亚线粒体颗粒的$\Delta\psi$

流动透析池的上部有20μ mol $S^{14}CN$（作为带电的可通透性阴离子）；NAD⁺、乙醇和乙醇脱氢酶（作为NADH-再生系统以提供底物）以及限制产生ΔpH的醋酸盐。亚线粒体颗粒（SMPs）在所标志的位置加入。$S^{14}CN$进入SMPs使得培养介质中同位素的浓度下降，结果使跨越透析膜的扩散速率以精确的比率下降。加入FCCP破坏了$\Delta\psi$，导致同位素从SMPs中流出，结果使得跨越透析膜的渗出速率增加（数据来源于Sorgato等，1978）。

4.2.3 $\Delta\Psi$和ΔpH的光学指示物

综述 Waggoner，1976；Bashford和Smith，1979

约200mV的$\Delta\psi$即相当于跨越能量转换膜有一个300,000V·cm^{-1}以上的电场。某些处于电场中的天然膜组份因而会改变它们的一些光谱特性，这是毫不奇怪的。这种电色作用（electrochromism）是因为这些分子中电子能级外加电场（imposed field）的影响。在这类$\Delta\psi$的内在探针中研究得最广泛的是色素，特别是光合成能量转换膜中的类胡

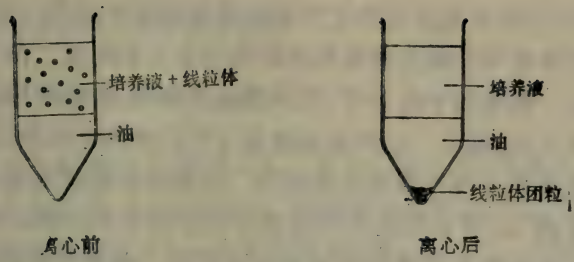


图4.5 线粒体硅酮油离心测定$\Delta\psi$

在无K^+离子但含有缬氨霉素、$^{86}Rb^+$离子、[^{14}C]-蔗糖以及^3H_2O的介质中，按希望的条件培养线粒体。样品加到含有硅酮油的小离心管中，在10,000 g离心1分钟。油下方的线粒体团粒可以被溶解用于液体闪烁计数，同时对上清也进行计数。借助培养物中的[^{14}C]-蔗糖可以计算出线粒体团粒中蔗糖可渗透部分的体积(V_s)，这可以给出由培养介质造成的基质外污染量。^3H_2O可渗透体积(V_H)与V_s之差给出了蔗糖不可渗透部分的体积，它被用来代表基质的体积(由于水能透过线粒体内膜而蔗糖不能)。假如线粒体团粒中的表观R^+_b-体积(V_b)也被计算出来，那么从Nernst方程即可推算$\Delta\psi$：

$$\Delta\psi=59\log 10\frac{(V_R-V_S)}{(V_H-V_S)}$$

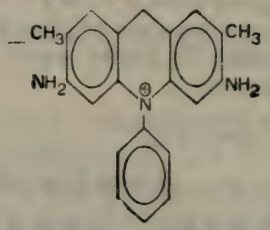
萝卜素(carotenoid)(第6.3节)。类胡萝卜素(对$\Delta\psi$)响应极其迅速(ns或更短)，并且能使光反应中的初级生电作用随之发生(第6.2节)。但是由于它们是结合在膜上的，故其局限性在于仅能对它们最接近的环境进行探测。由于表面电位(第3.6节)的影响可能很大，(所测结果)与通过分布技术测出的本体膜电位常不相符。

$\Delta\psi$和ΔpH的外在性探针(extrinsic probe)需要加到保温液中去。在图4.6中列出了一些已经证明是有用的分子的例子。还没有任何关于外在性探针能象内在性类胡萝卜素一样起作用，即它们也能始终附着在膜上并随所应用的电场而改变光谱的报道。实际上，虽然外在性探针对于追踪$\Delta\psi$和ΔpH是很有用的工具，但它们的作用机制却还是有争议的。其共同的特点是，当探针结合于细胞器或者积聚在细胞器中

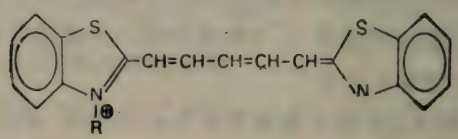
时，它们的吸收光谱或荧光发射光谱都要发生变化。这样，不用从培养液中分离这些细胞器就能知道它们的量。由于这类探针是一些大而平的分子，当局部浓度高时，具有形成分子堆集(stack)的能力。这种堆集降低了它们吸收光的能力，并且至少是某些表观光谱变化的原因。这种探针效应的复杂性表明，$\Delta\psi$ 和 ΔpH 以外的多种因素都会干扰它们，所以对于使用探针的条件必须极其谨慎地加以控制。光谱效应必须经常校准，例如以在缬氨霉素存在下由已知跨膜K^+离子梯度所产生的扩散电位(第3.6节)作参照(图4.7)。

A．阳离子性

1.酚藏花红



2.花青染料，例如



B．阴离子性

1.Oxonols，例如

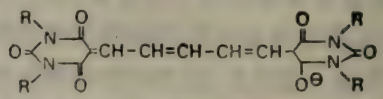


图4.6 一些膜电位的光学指示物

4.2.4 $\Delta\Psi$与ΔpH的相对贡献

综述 Gromet-Elhanan,1977

图4.8归纳了与调节$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$在$\Delta\psi$和ΔpH之间分配的有关的几个因素。从"非能化的"细胞器如线粒体开始,质子泵的孤立运行导致以$\Delta\psi$占支配地位的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的建立,就线粒体来说,膜的电容量是每净传递1n mol H^+mg蛋白$^{-1}$,跨越膜即建立约200mV的$\Delta\psi$。基质的pH缓冲能力约为每pH单位20n mol H^+mg蛋白$^{-1}$,所以每失去1n mol H^+只会使基质的pH值升高0.05单位(即$-60\Delta pH=3mV$)。因此99%的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$将会以膜电势的形式存在(图4.8b)。

随着$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的建立,接着就是带电的可渗透性离子的重新分布(图4.8c)。例如在缬氨霉素存在下K^+离子的吸收,或Ca^{2+}的吸收(第8.4节)都将消耗$\Delta\psi$,从而使$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$降低。呼吸链响应这个降低了的$\Delta\psi$,泵入更多的质子,结果使ΔpH增加。由于基质具有pH缓冲能力,吸收20n mol K^+(或者10nmol Ca^{2+}),将通过泵出20n mol H^+而平衡,并导致建立约1单位的ΔpH($-60\Delta pH=60mV$)。因为呼吸链只能使总$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$值恢复到和以前一般大小,这就意味着最终$\Delta\psi$值要比吸收阳离子以前低大约60mV。因此吸收阳离子会引起由$\Delta\psi$向ΔpH的重新分配。这个降低了的$\Delta\psi$说明这些条件下的阳离子吸收成为自我限制的,因为驱动力会稳步下降直至达到电化学平衡(式3.28)。例如,线粒体以Ca^{2+}离子吸收交换质子的泵出作用被限制在约20n mol·mg^{-1}蛋白(第8.4节),届时$\Delta\psi$会降低约120 mV(而$-60\Delta pH$增加)。

能够影响$\Delta\psi$和ΔpH相对贡献的第三个因素是电中性弱酸与弱碱的重新分布(图4.8d)。

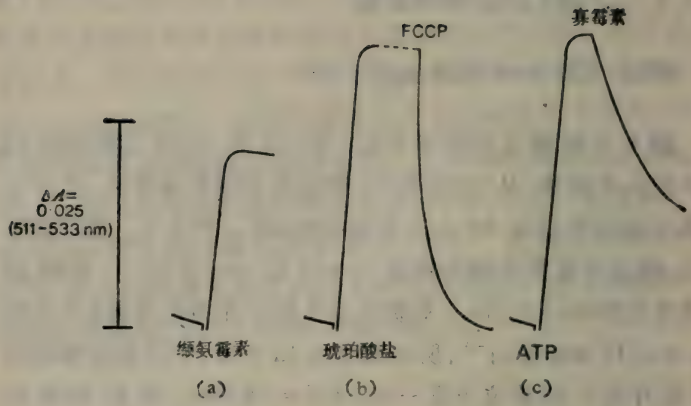


图 4.7 碱性藏红 (safranine) 作为线粒体△ψ的指示剂

肝线粒体在鱼鳔酮存在下保温以抑制呼吸作用(第5.6节).(a)加入缬氨霉素可以诱导出 124mV 渗透电势，介质中 K^+ 离子浓度为 0.96 mol/L,故假定在基质中可达120m mol/L。(b)加入呼吸底物琥珀酸可以诱导出△ψ，而质子移位体的加入则使之消失。(c)△ψ由 ATP 水解作用诱发,又因加入 ATP 合成酶抑制剂寡霉素 (第7.2节)而消失。培养液中含 10μ mol/L 碱性藏红。实验用双波长光谱仪进行 (第5.2节)

(数据来源于Åkerman和Wikström, 1976)。

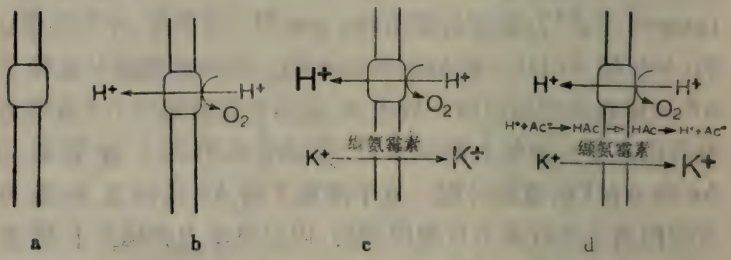


图 4.8 控制△$\tilde{\mu}$ $^+$在 △ψ和△p^H间分布的因素

a. 去能化的线粒体 △ψ=0 −60△p^H=0 △$\tilde{\mu}_{H^+}$=0

b. 呼吸作用起始 △ψ非常高 −60△p^H非常小 △$\tilde{\mu}_{H^+}$=220mV

c. 随△ψ而产生的对阳离子的带电吸收 △ψ 降低 −60△p^H增加 △$\tilde{\mu}_H$ 变成 220mV

d. 随 △p^H 而产生的对弱酸的电中性吸收 △ψ 增加 −60△p^H降低 △$\tilde{\mu}_{H^+}$变成 220mV 膨胀可能发生

例如，对于阳离子积聚所产生的 ΔpH，随后的弱酸吸收作用会耗散ΔpH，并允许呼吸链恢复 Δψ。然而，在阳离子和阴离子都被大量地积累的情况下，会引起基质渗透性膨胀（第 2.7 节）。但是当阳离子和阴离子分别是 Ca^{2+} 和 Pi 时不会发生这种现象，因为它们会形成一种非渗透性的活性钙磷复合物，从而防止了内部渗透压的增加（第8.4节）。

从上面的讨论可以清楚地看出，Δψ 和 ΔpH 的指示物是离子、弱酸或弱碱，如果不注意的话，它们本身就会影响所要测定的真实的梯度。在有缬氨霉素存在时就更是如此，因为这种离子载体调动基质的高内源 K^+ 离子，结果 Δψ 就会限制在初始 K^+ 离子梯度下的值。当使用"Skulachev"阳离子如 $TPMP^+$时，这种危险较小，这类离子可以在十分低的浓度下使用。

表4.2归纳了一些不同能量转换膜的典型的 Δψ 和 ΔpH 值。

4.3 呼吸链质子排出的化学定量计算

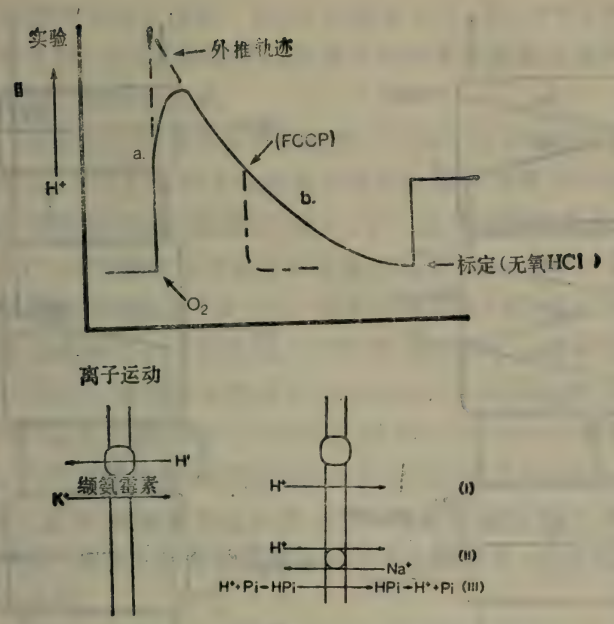
综述 Papa，1976；Mitchell等，1979；Reynafarje等，1979；Wikström和Krab，1980

在稳恒状态(steady-state)下不能直接测定呼吸链产生的质子流，因为此时排出的质子被重新进入的质子正好平衡了，故无法检测出质子流量。但是在质子重新进入之前，伴随着呼吸作用起动的最初的质子逐出是有可能测量到的。通过向存在着底物的无氧线粒体悬浮液中准确地加入少量的 O_2，并用迅速响应的 pH-电极监测质子流出量，则有可能获得该底物与 O_2 之间在这段呼吸链的 H^+/O 化学定量关系。图4.9列出了这种实验的操作细节，为了得到精确的结果，有几

件事必须谨慎。首先,应具有阳离子通透性,这样质子排出作用才能得到电荷补偿;防止$\Delta\psi$的建立,否则它会阻止质子进一步排出(第4.2节)。其次,O_2的加入量必须很小,以防止ΔpH达到饱和量。第三,无论呼吸作用的"脉冲"多么迅速,低的质子通透性总会使一些质子在突发的呼吸作用完成之前就已经反向渗透过膜(所以检测不到),因此应当考虑到这些质子的影响。假如在瞬间注入O_2的过程中使Pi(它们几乎总是在线粒体制剂中存在着)重新进入线粒体,这个问题会更大。在大多数线粒体中,H^+/Pi协同运输作用(第7.6节)非常活跃,由于诱导的ΔpH所引起的Pi吸收作用导致质子向基质中运动,因而对H^+/O化学计量关系估算不足。N-乙基马来酰亚胺(N-ethyl maleimide)对该协同运输作用的抑制会极大地增加表观H^+/O比率(Brand等,1976;Moyle和Mitchell,1978a)。O_2^-脉冲注入技术(O_2-pulse technique)可以有两方面的改进。第一,可以使用O_2以外的其他电子受体以便选择出呼吸链上有限的一部分,在这一部分中不涉及H^+/O比,而只使用$H^+/2e^-$比。第二,可以测定电荷间的化学计量关系(q^+/O或$q^+/2e^-$),而无须通过K^+运动的定量计算来得到质子的化学计量关系。尽管除H^+和K^+以外无其他种离子通过膜,电荷化学计量与质子化学计量并非同义词(见图4.10)。

向耗尽底物的线粒体悬液中加入底物时,测定其呼吸作用及质子排出的初始速率,是确定H^+/O比的另一种可供选择的方法(Brand等,1976)。

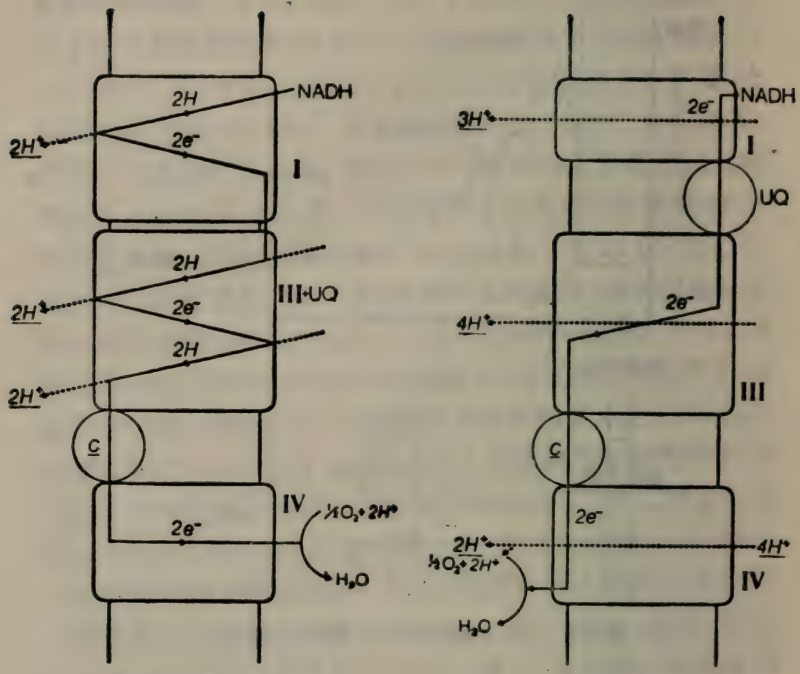
用这类方法测出的任何化学计量都必须满足热力学的严格要求,换言之,在质子电化学电位中所保留的能量只能处于质子移位区氧化还原跨度所规定的限度内。此外,已知复合体Ⅰ和复合体Ⅲ的质子移位区是处于近平衡状态,因为它们



a. 需氧相　b. 无氧相，与ΔpH衰减有关的因素

图 4.9　用氧脉冲注入技术测定线粒体的H^+/O比

所用装置与测定$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$（图4.3)的装置相同，但是不用钾电极。浓缩的线粒体悬浮液在无氧条件下，在含有底物、缬氨霉素及高浓度KCl的低缓冲介质中保温，pH电极必须反应迅速。小量的饱含空气的(含有约5n mol O mg^{-1}蛋白)的介质被迅速注入以开始瞬间反应。由于呼吸链作用2—3秒钟，同时用尽所加入的O_2，故介质中会出现迅速的酸化作用。为防止$\Delta\psi$的建立必须有缬氨霉素和K^+存在，否则$\Delta\psi$会抑制质子的进一步排出。O_2耗尽后，随着质子渗漏回到基质中去，pH亦衰减。这种衰减可以由以下原因引起：(i)膜对质子的通透性，在衰减状态加入FCCP，加速衰减；(ii)内源性Na^+/H^+反向运输；(iii)电中性Pi的进入（第7.5节)，必须用外推法对曲线进行修正，以便在O_2被消耗之前使质子重新进入。



a．回路呼吸链　　b．构象泵

图 4.10　呼吸链中质子与电荷的化学计量关系

	模型 a		模型 b	
	$H^+/2e^-$	$q^+/2e^-$	$H^+/2e^-$	$q^+/2e^-$
复合体 I	2	2	3	3
复合体 III	4	2	4	2
复合体 IV	0	2	2	4
琥珀酸-O_2	4	4	6	6
NADH-O_2	6	6	9	9

注意，$q^+/2e^-$涉及电荷跨膜运动，质子与电子二者都考虑到了。构象模型的化学计量是解说性的而不是确定性的。

能够很容易地被反转。因此，在知道 ΔE_h（第3.8节）和 $\Delta\mu_{H^+}$ 的组分后，这些区域的近似化学计量关系就能够从纯热力学的基础上被推导出来。

呼吸链质子移位区的明确的 $H^+/2e^-$ 化学计量关系的重要性，在于它们可用于检验质子移位机制的模型。Mitchell提出的直接基团移位机制中（第1.4节），质子被排出是由于电子从（$H^+ + e^-$）载体转移到了 e^- 载体的结果。对于每一个回路，该机制都需要精确的 $2H^+/2e^-$ 化学计量关系（图4.10）。这个直接机制也提出了一些结构上的要求，将在第5.4节中谈到。

用 O_2^- 脉冲注入技术对 NADH→O_2 和琥珀酸→O_2 的 H^+/O 比的早期测定（Mitchell 与 Moyle，1967a）所得到的值，与用直接机制预测的值是接近的（在图4.10中分别是6和4）。然而，由于发现能抑制 H/Pi 同向运输的 N-乙基马来酰亚胺（见上）会增加观察到的化学计量关系，这就引起了激烈的争论。

假若 $H^+/2e^-$ 化学计量关系太高以至不能用直接回路机制来说明的话，那么只好提出构象泵（conformational pump）机制（第5.4节）。这样的建议与回路假说（loop hypothesis）相比，它的假设难以验证，因为该机制能够被设计来解释任何观察到的化学计量关系。图4.10中给出了回路机制和构象泵机制的相关的性质。由于对精确的数字多有分歧意见，故给出的都是折衷的数据。应当注意的是，这两种机制对复合体Ⅲ都预测出了相同的化学计量关系，但是构象模型使得复合体Ⅳ有可能多转移两个质子（第5.9节），大概复合体Ⅰ也多转移了一个质子（第5.6节）。

4.4 ATP合成酶质子吸收的化学计量

综述 Mitchell 和 Moyle,1968; Moyle 和 Mitchell, 1973;Brand,1977

ATP 合成酶合成一个 ATP 所转移的质子的数目，可以通过测定已知小量 ATP 水解中的瞬间质子排出量，或者通过在平衡条件下 ATP/ADP+Pi 反应中 $\Delta\mu_{H^+}$和ΔGp 的热力学分析来计算。这种瞬间技术与 O_2- 脉冲注入法（第4.3节）类似，不过是用 ATP 而不是 O_2。但存在另外一些问题，一是ATP酶反应的本身会产生无向量质子（scalar proton）（式3.9）；二是ATP的进入和ADP及Pi的输出又会产生向量

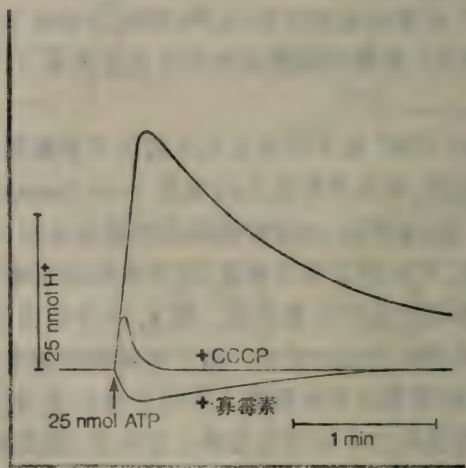


图 4.11 测定亚线粒体颗粒的H+/ATP化学计量关系

来源于牛心的亚线粒体颗粒在缬氨霉素的存在下于低缓冲力的 KCl 介质中保温，不加入呼吸底物。存在2m mol/LMg²+，因为ATP是以Mg²+-复合物存在的。选择6.1为初始 PH以便无向量质子从 ATP 的水解中释放出来。基线稳定后，加入 25n mol MgA TP。在寡霉素存在下看不到酸化作用，但是在一种质子移位体CCCP的存在下，会发生暂短的酸化作用并迅速消失（依照Thayer 与 Hinkle, 1973）。

质子(vectorial proton)(第7.5节)。用内翻外的亚线粒体颗粒(第1.4节)进行工作可解决第二个问题,通过调整pH而除去无向质子可解决第一个问题(Thayer与Hinkle,1973)。对线粒体ATP合成酶所得的值接近于$2H^+/ATP$(图4.11)。

热力学的方法已用于线粒体、亚线粒体颗粒、细菌泡囊和叶绿体的研究。在完整线粒体的情况下,这种方法经常可以得到3,但也不是没有变化(图4.12)。其中2个质子可归因于合成酶本身,另一个是被ADP、Pi和ATP转移的(第5.7节)。

呼吸链质子排出量以及在ATP合成作用中的质子重新进入量的化学计量必须与ATP合成作用所观察到的总的化学计量相一致(第4.6节),因此,

$$ADP/2e^- = H^+/2e^- \div H^+/ATP \qquad (式4.1)$$

普遍接受的最大值对$ADP/2e^-$是3;对$NADH \rightarrow O_2$是2(第4.6节),与H^+/ATP比为3的ATP合成和外运结合起来,其H^+/O比则分别为9和6,这将对构象模型有利,而不利于回路呼吸链模型,因为后者分别限定(上述两个量)为6和4(图4.10)。

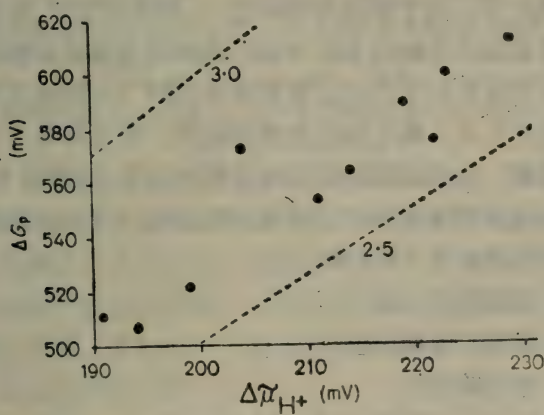


图 4.12 线粒体外磷酸化电位与$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的热力学关系

褐色脂肪组织线粒体在含有α-甘油-3-磷酸为底物的介质中保温，介质中还含有GDP以抑制线粒体中质子的"短路"作用(第4.5节)，含缬氨霉素、^{86}Rb、^{14}C-甲胺及^{3}H-醋酸盐以便测定$\triangle\tilde{\mu}_H^+$（第4.2节）。在ADP不断增加的同时，质子移位体FCCP作亚最适宜量的增加(第2.5节)。一旦达到稳态即测定每一种FCCP浓度下的$\triangle\tilde{\mu}_H^+$。在平行实验中，同样浓度的FCCP加到不含同位素但是含有^{3}H-ADP的相同的培养物中，达到稳态后即分析^{3}H-ADP和^{3}H-ATP的量，以便计算磷酸化电位(这里以mV表示)。虚线表示假如有2.5或3个质子用于1个ATP的合成与运输的话，对于特定的$\triangle\tilde{\mu}_H^+$所能保持的最高的磷酸化电位(数据来源于Nicholls和Bernson，1977)。

4.5 质子流、质子传导性及呼吸控制

前面几节已在质子回路中提及电位这个词以及产生和利用这一电位的转换复合体间的传动。本节将讨论质子回路中调节质子流的诸因素。

环绕着质子回路的质子流(JH^+)可以很方便地从呼吸率及H^+/O化学计量关系计算出来：

$$J_{H^+}=dO/dt\times H^+/O \qquad (式4.2)$$

因而对于某一底物来说，质子流和呼吸率是平行变化的。在化学渗透假说出现之前，线粒体呼吸控制的最重要的方面就已经确立了。这个理论成功处之一，即在于它对很多试剂的作用能直截了当地用它们对质子流的调节来进行解释。

自五十年代以来已经证明氧电极(图4.13)是研究线粒体的多用途的工具。氧电极仅直接测定单一反应即电子向O_2传递的速率。为获得其他线粒体过程的信息，就必须安排好保温条件以便使所希望的过程成为限速的。可以设计的限速步骤可能包括以下几种(图4.14)：

(a) 底物跨膜运输

(b) 底物脱氢酶活性

(c) 呼吸链活性

(d) 腺嘌呤核苷酸跨膜运输

(e) ATP合成酶活性

(f)膜的H^+-通透性

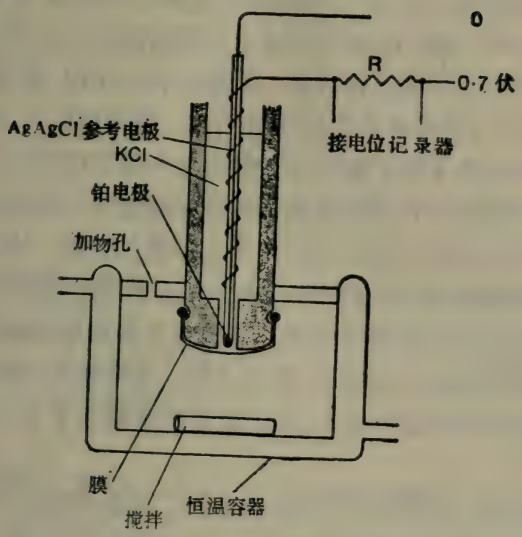


图 4.13 Clark 氧电极

在铂电极上，O_2被还原成H_2O。假如铂电极相对于Ag/AgCl参考电极始终保持−0.7V，那么就会产生与铂电极耗O_2率成比例的电流。在适宜的条件下，电流与溶液中的O_2浓度成比例。O_2可通透性薄膜能防止电极中毒。因为氧被电极消耗，所以必须持续搅拌保温液，以防止在膜上形成耗尽层（depletion layer）。保温室是密封的仅有一个加物孔。电极用空气饱和介质校准。随连二亚硫酸盐的加入而达无氧态。一个典型的保温室的体积为2 ml，需大约2−3 mg线粒体蛋白。

图4.1中列举了质子回路的三种基本状态：开路，没有明显的途径使质子重新进入基质；与ATP合成作用偶联的由重新进入的质子完成的回路；以及不与ATP合成作用相偶联的由渗漏质子完成的回路。这些状态都很容易在氧电极恒温室中制造出来（图4.15），并且参考Chance和Williams（1955）提出的方法（表4.1）。

当线粒体受温育时（图4.17），会引起呼吸作用突发，随即

降到低速率的状态 4。虽然线粒体在其基质中也含有腺苷酸,但是含量相对地小(约10nmol mg^{-1} 蛋白),并且当线粒体被加入到保温液中时,这个库会极迅速地被磷酸化,直至与 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 达到平衡。随后的状态 4 呼吸作用的发生是由于线粒体内膜对质子并非完全不通透的,即使不存在 ATP 的净合成,质子仍然可以缓慢地通过膜渗透回去。缓慢的 Ca^{2+} 跨膜循环是对这种状态 4 质子渗漏作贡献的一个因子(第8.4节)。

实际上控制呼吸作用速率的是跨越呼吸链质子移位区的氧化还原电位与 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$(第3.9节)间失去平衡的程度。在状态 4,呼吸作用被自动调节以至呼吸链排出质子的速率与质子跨膜渗回的速率达到精确的平衡。假如质子排出速率瞬时间即超过了质子重新进入的速率,那么 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 就会增高,呼吸链和 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 间的不平衡态会变小,质子流量也会随之下降以恢复稳态。

在图4.15中,外源 ADP 的加入干扰了状态 4 呼吸作用,使得基质 ATP 通过腺苷酸移位体(第7.5节)与所加入的 ADP 进行交换。结果,基质中 ATP/ADP+Pi 体系的 ΔG 变小,干扰了 ATP 合成酶的平衡态。接着,如下情况会依次发生:(a)ATP 合成酶沿着合成 ATP 的方向运行,质子重新进入试图使 ΔG 复原;(b)质子的重新进入降低了 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$;(c)呼吸链与 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 的不平衡态增加;(d)质子流及呼吸作用下降。就状态 4 而论,加速了的状态 3_{ADP} 呼吸作用是自我调节的,故质子排出作用可与(增加的)质子跨膜重新进入的速率平衡。ATP 的净合成与状态 3_{ADP} 呼吸作用可以用以下三种方式来终止:(a)足够量的 ADP 被磷酸化为 ATP 以恢复平衡态;(b)加入如苍术苷(atractyloside)之类的抑制剂,抑制腺苷酸跨膜交换(第7.6节);(c)加入如寡霉素等来抑制ATP合成酶(第7.3节)。

图 4.14 氧电极在线粒体能量转换作用中的应用

在本图解中表示了六种影响线粒体能量转换作用的可能方式。氧电极图线显示了如何使用氧电极来研究这些干扰作用。假定保温介质中含渗透支持物、pH缓冲力及Pi。

(a) 底物运输被抑制 (b) 底物脱氢酶被抑制 (c)呼吸链被抑制

(d) 腺苷酸移位体被抑制 (e) ATP合成酶被抑制 (f) 加入质子移位体

呼吸链与质子电化学电位之间能量转换作用的效率非常高，它们之间微小的热力学不平衡就会引起可观的的能通量流（energy flux）。所以在图4.16表示出，当加入ADP引起迅速的状态 3_{ADP}呼吸作用时，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$只降低不到30%。在呼吸链与$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$间的实际不平衡更小些，因为氧化还原跨距也降低了（第5.3节）。

处于状态 3_{ADP}的有效的能量转换作用在ADP合成酶中也是明显的。在$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$和ΔG_P间微小的热力学不平衡状态即可维持高速率的ATP合成作用。

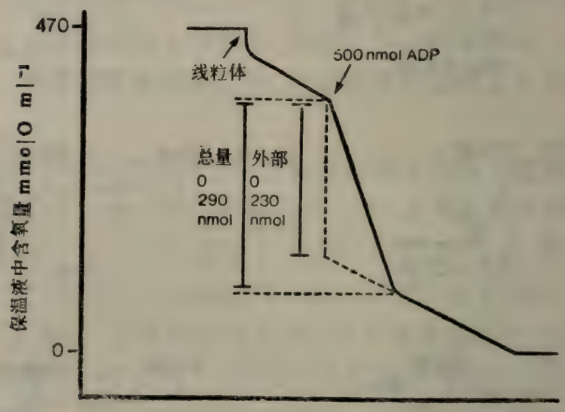


图 4.15 利用氧电极测定ADP/O的比率

在此例中，鼠肝线粒体以琥珀酸作底物保温（加入鱼藤酮以抑制任何与内源性NAD+有关的呼吸作用）。标出了加入ADP的部位。当全部ADP实际上都被磷酸化后，呼吸作用回到低速率的状态4。如果假设引起状态4呼吸作用的质子渗漏在被催化的状态3呼吸作用中仍然维持同样的速度，那么计算ADP/O比率时只好取额外的0。另一方面，假若在状态3中渗漏停止，那么全部呼吸作用都会被用于ATP合成，所有0都被利用。实际上这后一种情况更为精确，因为质子渗漏高度依赖于$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$，稍微减少就会带来很大影响（图4.16）。所以在此例中

$$ADP/O = 500/290 = 1.72$$

质子移位体通过在膜的双分子层区引起人工质子通透性而使氧化磷酸化作用解偶联(第2.5节)。这样,它们的作用可以超过质子重新进入的抑制作用,这种抑制能导致ATP的净合成。从而,无论是存在寡霉素还是苍术苷,或者是缺乏ADP,质子移位体诸如FCCP都能引发迅速的3_{unc}状态呼吸作用(图4.14)。

呼吸链与$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$相呼应,如同$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$可以被ATP合成酶降低一样,它也会因质子移位体的加入而降低。在上述两种情况下,质子排出的(以及呼吸作用的)速率都在调节中,直至它精确地平衡了质子跨越内膜重新进入的速率时为止。若由$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$驱动的质子重新进入的速率与由呼吸链和$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$间的不平衡所驱动的质子排出作用的速率相当,则此时的$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$是

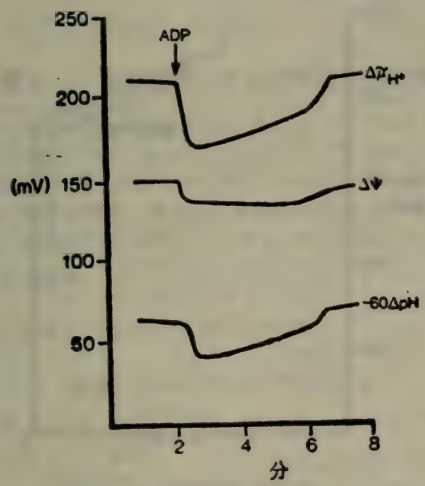


图 4.16 当ADP加入肝线粒体使状态4转变为状态3时,$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$仅有适度的下降

肝线粒体温育在含β-羟丁酸为底物的蔗糖介质中,$^{86}Rb^+$与缬氨霉素用于测定$O\psi$,用^{14}C-甲胺与^3H-乙酸测试ΔpH。箭头所指处加入足量的ADP以维持状态3呼吸5分钟。$\Delta\psi$与ΔpH用膜过滤法测量(根据Nicholls, 1974)。

稳定的。呼吸作用不会因为更多的质子移位体加入到保温液中而继续无限制地增加，因为当呼吸链中的动力因子成了限速因子时，反应就达到一个阶段了。这时的呼吸作用是不受控制的，就是说它不再依赖于热力学非平衡态。一般当 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 还很高时非受控呼吸作用(uncontrolled respiration)就已开始了（图4.17）。必须把呼吸控制不明显的情况($\Delta\mu_{H^+}=0$ 到170mV，图4.17)与线粒体完全去能化的情况($\Delta\mu_{H^+}=0$)区别开来。

在电回路中，一个成分的电导是根据单位电位差下的电流量计算得出的，运用同样的方法可以算出质子回路中膜的有效质子传导性(C_MH^+)：

$$C_MH^+=J_{H^+}/\Delta\tilde{\mu}_{H^+} \qquad (式4.3)$$

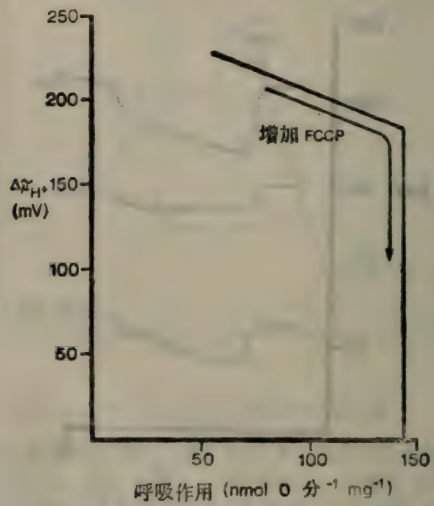


图 4.17 呼吸速率作为$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的函数

来源于褐色脂肪组织的线粒体在含有以甘油-3-磷酸作底物的介质中保温。介质中有寡霉素以抑制ATP合成酶，GDP以抑制线粒体所特有的天然质子导体(第5.4节)。提高加入的质子移位体的浓度，同时测定呼吸作用以及$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$(根据Nicholls和Bernson，1977)。

在表4.3中列举了典型肝线粒体制剂C_MH^+的计算方法以及在第4.6节里讨论过的其他化学渗透前参数(pre-chemiosmotic parameters)。

膜对内源性质子传导性的大小是一个基础参数，它决定了某种线粒体制剂的生物力能学行为。如将要在第4.6节中讲到的，所有“能化”的非化学渗透参数都可以一、一归结于C_MH^+。显然，对于一个高效的能量转化作用，其C_MH^+要尽可能地小。但是存在着一类线粒体，其内膜的质子传导性显示了生理性的增加。褐色脂肪组织能够进行非常迅速的呼吸作用，以便产生热量或者是作为调整肥胖的方式以消耗掉过剩的底物。在这种组织中，内膜中的一种蛋白质对正常呼吸

表4.3 线粒体能量转换作用参数的计算

问题 典型的肝线粒体制剂在状态4(表4.1)下氧化琥珀酸，具有呼吸率为15n mol O $min^{-1}mg^{-1}$蛋白质，并维持220mV的$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$，加入低浓度的质子移位体FCCP会增加呼吸作用至100n mol O min^{-1}mg蛋白质$^{-1}$，并使$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$降至40mV。若假设从琥珀酸到O_2的H^+/O比是6，计算FCCP加入前后的呼吸控制率、质子流量及有效的质子传导性。

(a) 呼吸控制率$=\dfrac{\text{加入FCCP后的呼吸作用}}{\text{加入FCCP前的呼吸作用}}=100/15^{\bullet}=6.7$

(b) 质子流量＝呼吸作用×H^+/O比$=90(-FCCP)$

$600(+FCCP)$

(单位：n mol H^+min^{-1}mg蛋白质$^{-1}$)

质子传导性 $C_MH^+=\dfrac{\text{质子流量}}{\Delta\tilde{\mu}_{H+}}=90/220=0.41(-FCCP)$

$600/40=15(+FCCP)$

(单位：n molH^+min^{-1}mg蛋白质$^{-1}mV^{-1}$)

• 原文为100/6，应为100/15.——译者

的控制超过根据ATP的需要所进行的控制。这种蛋白质作为一个可调节的质子移位体而允许质子的重新进入，以致状态3呼吸作用无需与合成的ATP形成化学计量关系（Nicholls, 1976, 1979）。该蛋白质的活性足以增加 C_MH^+ 的值至高于其他线粒体正常值的30倍。

4.6 能量转换作用的非化学渗透参数

4.6.1 呼吸控制率

这是一个用来估计线粒体制剂完整性的化学渗透前参数。它被定义为用 ATP 最大量合成时间(即存在ADP)或者存在质子移位体时的呼吸速率除以无 ATP 合成或者没有质子移位体存在时的呼吸速率所得的商。即:

$$\text{呼吸控制率}=\frac{\text{状态 3 呼吸作用}}{\text{状态 4 呼吸作用}} \qquad (\text{式 4.4})$$

这个比率对于不同的制剂来说通常为3到15。尽管经验表明这一个参数很有用,但意识到它是混合函数(hybrid function)也是重要的：因为状态4速率依膜的天然 C_MH^+ 而定,而状态3速率却可以依赖于状态3中任何一个限速的步骤，它可以是底物通透性,底物脱氢酶活性,呼吸链，ATP 合成酶,或是腺苷酸移位作用。因此在解释呼吸控制率时必须谨慎。关于呼吸作用与ATP合成偶联的紧密程度,状态4速率可能是一个更好的指标。

4.6.2 ADP/O 比与 P/O 比

呼吸链质子移位作用与 ATP 合成作用的化学定量关系被确定下来，尽管其实际值还是有争议的，因为与呼吸作用有关的ATP合成的总的化学定量关系可以从理论上的最大值，即由每一能量转换区域每2e-可合成一个 ATP 到无

ATP 合成。这要取决于绕过 ATP 合成酶的与 $2e^-$ 平行的质子渗漏途径的活性(图4.1)。任何增加渗漏传导性的因素都将降低通过 ATP合成酶重新进入的质子的比例。另一个因素是,当$C_M H^+$增加时,随着$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$降低,(图4.7)合成ATP的热力学能力也降低。在ATP合成过程中估计渗漏流量是很困难的,因为通常是从无质子渗漏的外推情况来计算,故得出的数值有相当的误差。

4.6.2.1 用氧电极技术测定ADP/O比

前向正在进行状态 4 呼吸的线粒体中加入很小的已知量的ADP时(图4.17),用氧电极技术可测量出被加速的状态 3 呼吸作用的释放量。几乎所有加入的 ADP 都被磷酸化为 ATP,当状态 4 恢复后,ATP 与 ADP 的比率为典型的100:1,而且可以计算出加入的 ADP 与消耗掉的氧间的摩尔比。为了对质子渗漏进行校正,按照常规是,假设在状态 3 呼吸作用期间渗漏停止。初看起来,在 ADP 循环中(图4.16)由于$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$只下降了约30%,渗漏会继续下去不会减弱,但是实际上,当$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$低于200mV后,渗漏传导力几乎完全消失了。所以在计算这一比值时,考虑到循环中氧的总吸收量会更正确些。

4.6.2.2 用葡萄糖-己糖激酶捕获法(glucosehexohinase trap)测P/O比

这第二种方法是基于ADP和^{32}Pi合成$[\gamma-^{32}P]$-ATP,随后通过加入己糖激酶将标记物捕获在葡萄糖上,又产生ADP:

$$ADP + {}^{32}Pi \longrightarrow [\gamma-^{32}P]-ATP$$

$$[\gamma-^{32}P]-ATP + 葡萄糖 \longrightarrow 葡萄糖-6-^{32}P + ADP$$

在此法中用氧电极来监测呼吸作用：经过一定量的氧消耗后，停止反应，把葡萄糖-6-^{32}P与^{34}Pi分离开来并进行计数。在ADP连续重新生成时并不能观察到呼吸刺激现象。与氧电极技术相比较，ΔG_p始终被己糖激酶保持在低水平。因而ATP合成可以在很不利的条件下被检测到。

正如其他化学计量关系一样，ADP/2e$^-$比值是引起争论的根源。每个质子移位复合体的每2个电子对应于1个ATP的"经典值"，仅仅符合NADH-O_2和琥珀酸-O_2的H^+/O比率分别为6和4的情况，假如只有两个质子被用于ATP合成及腺苷酸和Pi的跨越内膜运输的话。然而强有力的证据表明运输作用消耗了第三个质子(第7.6节)。对于NADH和琥珀酸来说，H^+/O比值较高，分别为9和6，这是与包括运输在内的H^+/ATP比值为3相符合的。Brand等人(1978)曾经提出，从琥珀酸到细胞色素c及从细胞色素c到O_2的ADP/2e$^-$比值并非整数，而分别为0.67和1.33。

4.7 反向电子传递和由水解作用驱动的质子回路

ATP合成酶是可以往返双向运行的，在$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$持续产生和细胞不断使用ATP的限制下，它朝ATP净合成的方向运行。假如抑制呼吸链并将ATP提供给线粒体的话，ATP合成酶就会显示ATP水解酶的功能，产生的$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$相当于呼吸链(产生的$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$的值)(图4.17)。由ATP水解作用而产生的质子回路必须通过质子重新进入基质来完成。因而质子移位体能加快ATP水解的速率，就象它们能加快呼吸作用的速率一样，这就是"解偶联剂刺激的ATP水解酶活性"。

区分一个线粒体的能量依赖过程是由$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$直接驱动的，

还是间接地通过 ATP 作用的，经典的方式是测定该过程对 ATP 合成酶抑制剂寡霉素(第1.4节)的敏感性。一个由$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$驱动的反应，当膜电位是由呼吸作用产生时，一定对寡霉素不敏感；而当$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$是由ATP水解作用产生时，则会很敏感。对于一个依赖于 ATP 的反应来说则刚好相反(图4.18)。

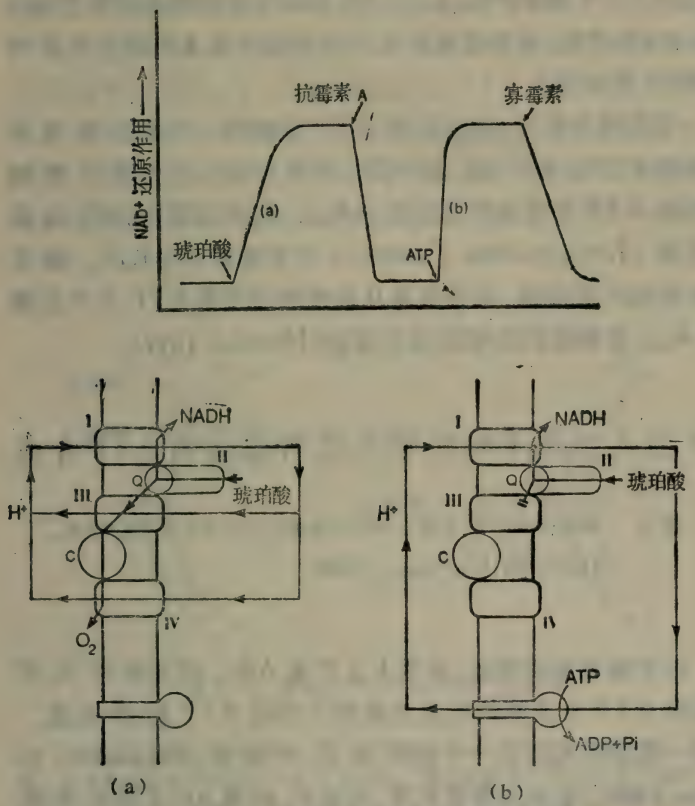


图 4.18 线粒体呼吸链中的反向电子传递

超声得到的亚线粒体在NAD+的存在下保温的图示。在(a)中，复合体I反向电子传递引起了NAD+还原反应(在340nm处测定)。琥珀酸既作为反向电子传递作用的电子供体，又作为复合体 III和 IV的底物。在(b)中，琥珀酸只把电子提供给NAD+，$\Delta_H\tilde{\mu}_{H^+}$由ATP水解产生，复合体III被抗霉素A抑制。

在状态 4 中，$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 和跨越复合体 Ⅰ、Ⅲ的氧化还原跨距之间的近平衡状态(图4.2)表明，可以设计出一种条件，它使得呼吸链中的这些片段能够诱导成反向运输，由流向内部的质子流来驱动它们。必须注意，这对复合物Ⅳ不适用，它是根本不可以逆转的。可以通过两种方式来引起反向电子传递，即利用 ATP 水解来产生 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$，或者利用琥珀酸或细胞色素 c 向O_2的电子流，分别使经由复合物 Ⅰ 或 Ⅰ 及 Ⅲ 的电子传递作用倒转(图4.18)。

在生理条件下，线粒体的 ATP 合成酶一般不会被用来作为质子移位 ATP 酶，除非是在缺氧时期需要利用糖酵解产生的 ATP 来维持线粒体的 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$。然而当某些细菌如粪链球菌 (*Streptococcus faecalis*) 在葡萄糖中生长时，缺乏具有功能的呼吸链，完全依靠从糖酵解得到的ATP 来产生跨膜$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$，使得它们能够运输代谢物(Harold，1977)。

4.8 由人工质子电化学电位所驱动的ATP合成

综述　Jagendorf，1975；Mitchell，1976b；Kagawa，1978；Fillingame，1980

化学渗透假说预言，利用人工产生 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 就能够在具有功能的 ATP 合成酶的能量转换膜上引起 ATP 的净合成。使这一预言实现的第一个证明来自叶绿体(Jagendorf 和 Uribe，1966)。这两位作者发现，在暗处，酸性 pH下处于平衡状态的叶绿体，当外部pH突然由 4 增加到 8 时产生 4 个单位的瞬时跨膜 pH梯度，便能够诱导合成 ATP(图4.19)。

通常，叶绿体是在高 ΔpH 和低 Δψ 下工作的，而线粒体

的工作方式则恰好相反。利用人工 $\Delta\tilde{\mu}_{H+}$ 合成 ATP 的首次成功是在跨越亚线粒体颗粒膜建立了 pH 梯度和 K^+ 离子扩散电势时发生的(Thayer和Hinkle,1975)。

用完整细胞器进行的实验表明,以 $\Delta\tilde{\mu}_{H+}$ 作为唯一能量来源即可以合成 ATP,但是这些实验不能区别两种能量转换模型。在一种模型中,$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$ 是电子传递与 ATP 合成间的唯一联系;而在另一种模型中,质子泵位于旁路与可选择的中间介质相平衡(图1.11)。为此有必要将 ATP 合成酶纯化直至它不含有任何与呼吸链质子移位体相同的组份,并把它组装到人工膜上(第1.3节),然后用于人工$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$的研究。利用高度纯化的耐热菌ATP合成酶已经完成了这种研究 (Sone 等, 1977)。

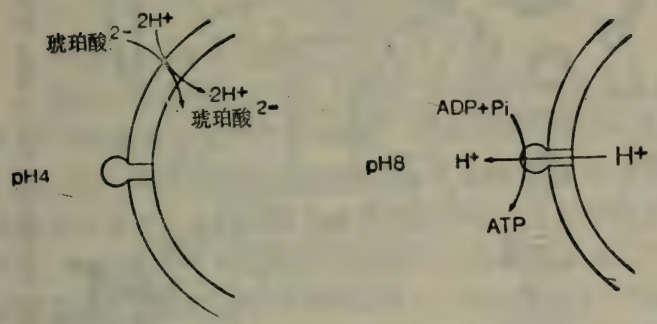
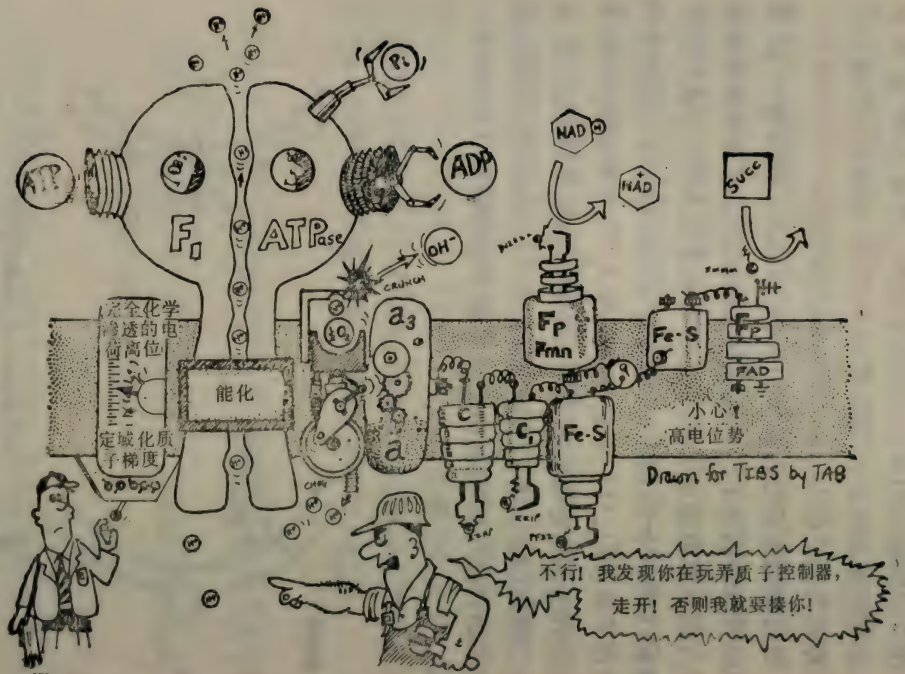


图 4.19 酸浴实验——△pH能产生ATP

外膜被打碎的叶绿体 (第1.3节) 在黑暗中于pH 4 的含有琥珀酸的介质中保温. 有抑制剂存在以抑制任何电子传递体. 琥珀酸缓慢地进入类囊体腔中,释放出质子使得类囊体腔中的pH值降到4左右(左图). 然后将其外部pH突然增至8, 产生一个值为4的跨膜△pH, 同时加入 ADP、Pi和Mg^{2+}(右图). 通过 ATP 合成酶的质子流出导致 1 mol合成酶合成高达100 mol的 ATP 。人工合成的质子移位体如FCCP 可以抑制ATP的合成(数据来源于 Jagendorf和Uribe, 1966)。



线粒体的呼吸链和ATP合成酶：定域化质子回路/非定域化化学渗透的争论

5 呼 吸 链

5.1 引 言

线粒体的呼吸链装配有20个以上不连续的电子载体，以及数目不定的“结构”多肽(图5.1)。虽然关于呼吸链的功能是氧化还原反应驱动的质子泵这一点已被接受，但是对这一功能的结构基础却未能全部理解。本章将介绍线粒体和细菌呼吸链的结构研究已进行的工作。

5.2 线粒体呼吸链的组分及研究方法

综述 Slater, 1974

通过1.1v的氧化还原电位跨距，呼吸链将电子从NAD^+/NADH电偶传向$O_2/2H_2O$电偶。许多呼吸链是可以反转的(第4.7节)，为了能够催化正、反两种方向的反应，氧化还原组分必须在其氧化态和还原态都以可估计的浓度存在的条件下工作，换言之，一个电偶的工作氧化还原电位E_h(第3.3节)一定要与该电偶的中点电位E_m差不多。如在图5.11中所要表明的，一般都能服从这一规律，随后对于呼吸链内的氧化还原载体的明显的随机选择性，也将阐明其基本原理。

来自柠檬酸循环可溶性脱氢酶的最初的电子传递需要一个协同因子。它应具有一个在−300mV区的中点电位并且是完全可动的(mobile)，以便在基质脱氢酶与膜结合的呼吸链间往返运行。NADH/NAD^+电偶可以行使这一功能，它的中点电位$E_{m,7}$为−320mV(图5.2)。

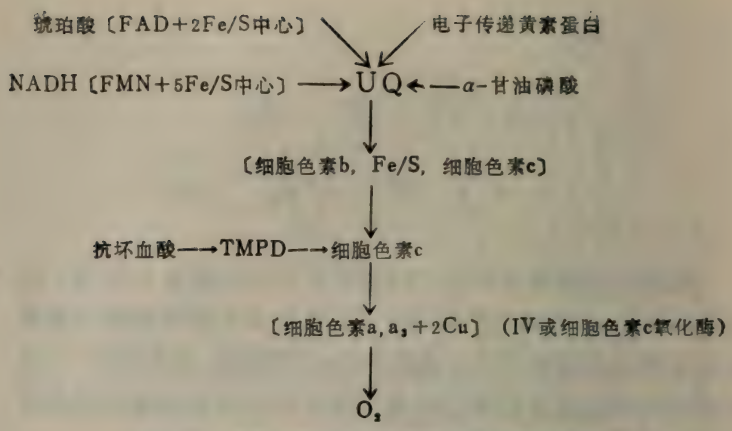


图5.1 线粒体呼吸链中氧化还原载体的线性顺序

列在方括号中的氧化还原载体组分别代表结构上的复合体I到复合体IV。

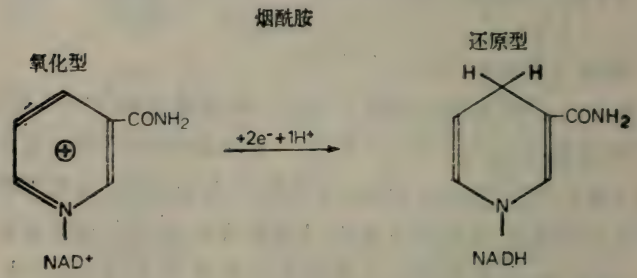


图5.2 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)NAD+

烟酰胺-核糖-P-O-P-核糖-腺嘌呤

当大多数电子以这种方式被输送进呼吸链时，一组酶即催化底物电偶中点电位近于0mV的脱氢反应。琥珀酸脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶和“电子传递黄素蛋白”(从脂肪酸β-氧化反应传递电子)在接近0mV的电位下，无须NAD/NADH⁺电偶作中间媒介即可将电子直接交给呼吸链(图5.1)。这种直接的转移要求上述酶类直接与呼吸链接触，换言之，要结合在膜上。

呼吸链中的氧化还原载体有：黄素蛋白，它含有紧密结合的FAD或FMN作为辅基(图5.3)，经历（$2H^+ + 2e^-$）还原反应；细胞色素，含有卟啉辅基，经历1 e^-还原作用；铁硫（或非血红素铁）蛋白，具有辅基并在1e^-步骤中被还原；泛醌，是一类游离的、脂溶性辅助因子，可以被($2H^+ + 2e^-$)还原；最后还有蛋白结合Cu，从Cu^{II}被还原成Cu^{I}。

可根据细胞色素中卟啉辅基的结构对它们进行分类。线粒体含有a型、b型和c型细胞色素。在某些细菌呼吸链中细胞色素d和细胞色素o作为末端氧化酶，细胞色素o是一类可以自行氧化的b型细胞色素，而在细胞色素d中代替卟啉环的是一个部分饱和的二氢卟酚环。

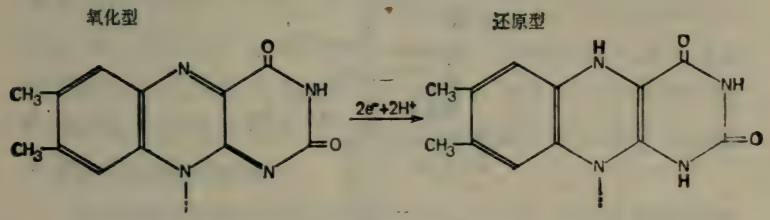


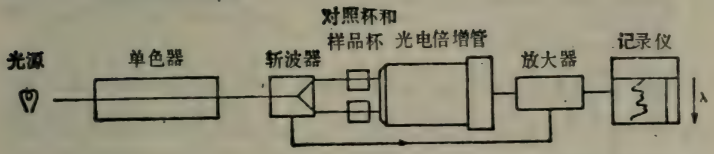
图5.3 黄素单核苷酸（FMN）和黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）

FMN：7,8-二甲基异咯嗪-D-核糖醇-P

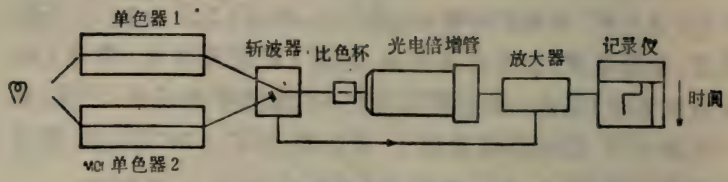
核黄素

FAD：7，8-二甲基异咯嗪-D-核糖醇-P-O-1'-核糖-腺嘌呤

a. 双光束分光度计



b. 双波长分光光度计



c. 快速动力学：断流与双波长分光光度计结合

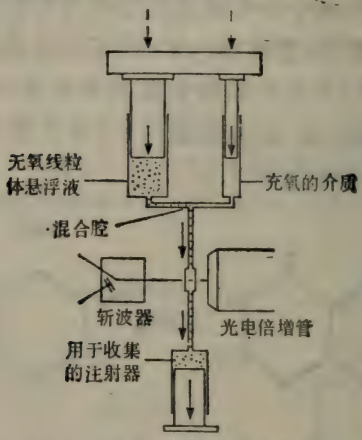


图5.4 研究呼吸链的光谱学技术

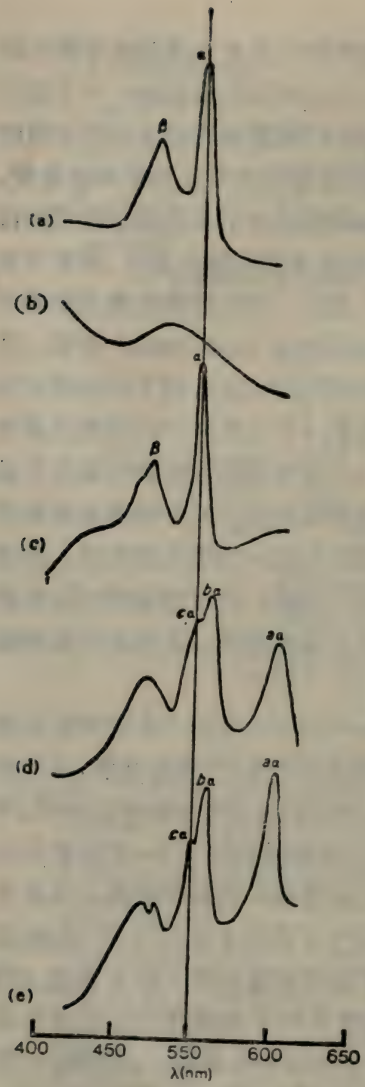
(a) 通过一个单色器 (monochromator) 的分光束分光光度计 (split-beam spectrophotometer)，其发出的光〔通过一个在300Hz振荡的斩波器 (choPPer)〕可直接交替进入对照杯或样品杯中。它使用一个大的光电倍增管(photomutiPlier)，交流讯号被放大并翻译，这样放大器的输出讯号即与两个比色杯间的吸收作用的差成比例。假如单色器的波长不断增加，就可以得到一个样品-对照的差光谱。因此可以利用分光束来标绘不随时间变化的差光谱。

(b)双波长分光光度计使用两个单色器：一个单色器定在对该瞬变光(transinet)最适宜的波长上，另一个则定在没有变化发生的附近的等消光点(isobestic point)上，当瞬变被引发后，从这两个单色器中出来的光交替通过同一个比色杯。放大器将光电倍增管的输出讯号翻译过来，记录器表示出在瞬变过程中消光差($\lambda_1-\lambda_2$)对时间作图。故双波长可用追踪所给出的光学物质的动力学过程。

(c)在很多情况下，手工混合太慢以致使动力学过程难于分辨。这种双波长可以作些改进，即将两个注射器中的物质推过一个混合腔 (mixing chamber) 进入比色杯中，可以在几毫秒之内使线粒体悬浮液与引发瞬变的试剂混合并通到比色杯中。当流动持续时，由混合腔与比色杯之间的管道长度所决定的混合物的"年龄"将保持恒定，当流动停止时，混合物"年龄"将随之增长，这是可以被追踪的。

这些细胞色素由于它们特异的可见光光谱而成为最先被检测出来的组分。每一种氧化态的细胞色素都有一个主要的吸收带，而大多数细胞色素当它们被还原后都显示三个吸收带。但是，由于线粒体的高度非特异性光吸收作用和光散射，特别是因为代谢诱导的基质体积变化会引起光散射作用的改变（第 2.7 节），所以在研究线粒体中的细胞色素时，其绝对吸收光谱的用途有限。由于这个原因，研究细胞色素光谱要用灵敏的差式（differential）或称分光束（split-beam）光谱。在这种光谱中，波长持续增加的光被分开，进入两个分别盛有完全相同线粒体的比色杯，但其中一个比色杯中的细胞色素发生了不同的还原作用（图 5.4）。由样品比色杯中的输出自动地减去由对照杯中的输出，以便除掉所有的非特异性吸收作用。图 5.5 给出了分离后的细胞色素 c 的氧化态光谱、还原态光谱以及还原态减去氧化态的光谱，还有自亚线粒体颗粒得到的复合的还原态减去氧化态的差光谱，在这里所有细胞色素的吸收峰都重叠了。

根据每种细胞色素在 550—610nm 区的 α 吸收带能很容易把它们分辨出来。在液氮温度（77°K）下测量光谱，由于分子运动和冰晶的多次内反射，增加了通过样品的有效光程，降低了线宽，因而可以增强光谱带的锐度（图 5.5）。室温差式分光光谱只能清楚地区分 a 型、b 型和 c 型细胞色素。但是目前已经知道，它们每一种又各包含了两个光谱上不同的组分。在CO存在下，a 型细胞色素能够被分成 a 和 a_3 两类，CO 特异性地与 a_3 结合，可是不清楚 a 和 a_3 是否代表了化学上不同的两类物质。b 型细胞色素也由两类物质组成，它们对于所建立的跨膜 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 的反映不同（第 5.8 节）。这两类组份被记作b_T（或b_{562}）和 b_K（或 b_{566}）。最近的证据（第5.8节）表明，b 型细胞色素是单一化学种类的，但是在呼吸链上以双体行使功能。



(a)细胞色素c：完全还原态光谱

(b)细胞色素c：完全氧化态光谱

(c)细胞色素c：还原态光谱减氧化态光谱所得差光谱

(d)牛心亚线粒体颗粒：室温差光谱（还原态光谱减去氧化态光谱）

(e)牛心亚线粒体颗粒：77°K差光谱（还原态光谱减去氧化态光谱）

图5.5 可见光区的细胞色素光谱以水作对照用分光束分光光度计得到的纯化的细胞色素绝对还原态(a)和氧化态(b)的光谱。将还原态的细胞色素c放在样品杯中，而将氧化态的细胞色素c放在对照杯中，即可得到纯净细胞色素c的还原态减去氧化态的差光谱(c)。(d)是牛心亚线粒体颗粒还原态减去氧化态所得到的差光谱。在样品杯中加入连二亚硫酸盐以使亚线粒体保持还原态，而在对照杯中则加入铁氰化物。在液氮温度下(77°K)重复扫描而得到(e)，注意较陡的α带。承蒙W.J.Ingledew允许使用这些光谱。

在低温下，细胞色素 c 和细胞色素 c_1 这两类 c 型细胞色素可以从光谱上分辨开来。细胞色素c_1是复合体Ⅲ（第5.8节）中的一个内部蛋白，而细胞色素 c 则是位于（线粒体内）膜c侧的一个外周蛋白，它把复合体Ⅲ与细胞色素氧化酶联系起来。

早期对于细胞色素的鉴定和研究曾借助于它们独特的可见光光谱，而另一类主要的电子载体铁硫（Fe/S）蛋白（图5.6）的可见光光谱难于确定，但有特征电子自旋共振谱（ESR 或 EPR），见Beinert（1978）和图5.7。氧化态或还原态的不同的铁硫蛋白中可能存在的不成对电子产生了这种 EPR信号。每个可以被EPR检测到的Fe/S基团被称作一个中心或集群（cluster）。（铁硫蛋白的）一条多肽链可能含有一个以上的中心。

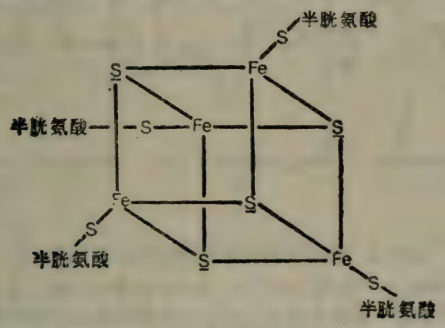


图5.6　铁硫中心

这是一个有 4 个Fe和 4 个酸不稳定的硫中心。在酸处理时，那几个下面划线的硫会以H_2S的形式释放出来。虽然它有4个Fe 原子，但是整个中心只经历单电子氧化还原反应。

尚不清楚在线粒体呼吸链中究竟有多少铁硫中心；在复合体Ⅰ含有 7 个之多（第5.6节）。

铁硫蛋白中的铁原子通过胱氨酸中的硫与脱辅基蛋白共价相联，并且通过酸不稳定性硫桥与另一个铁原子相联（图5.6）。铁硫中心可能含有2或4个铁原子，但是每个中心只能作为一个单电子载体。铁硫蛋白在能量转换电子传递链中广泛

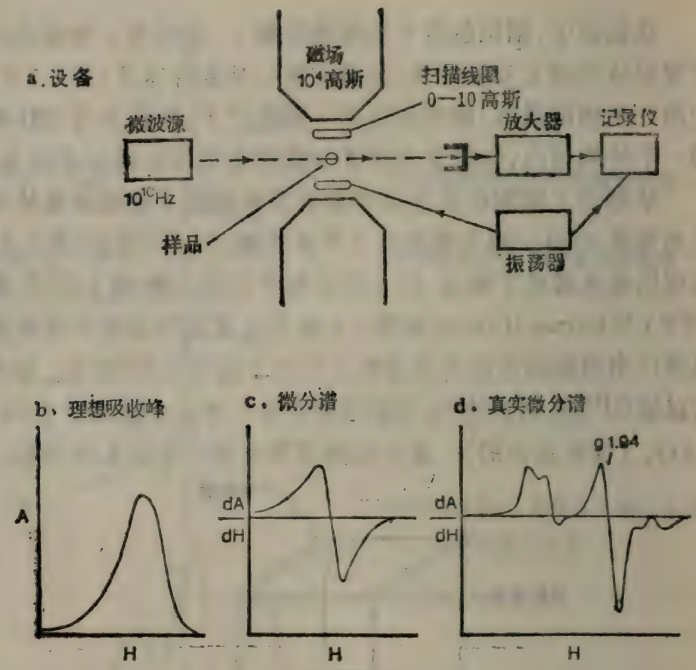


图5.7 电子自旋共振与铁硫中心的检测

(a) 设备：微波源产生约为 10^9Hz，30cm 的单色辐射。在一个外加磁场中，样品里的不成对电子会吸收辐射。吸收作用所需磁场的精确值取决于该电子的分子环境。根据方程 $h\nu=g\beta H$ 这里的 h 是普朗克常数，ν是辐射频率，β是波尔磁子常数，H 是外加磁场，g是该物质的特征光谱常数。保持微波频率稳定而改变磁场即可得到曲线b。实际上，将稳定增加的磁场与通过辅助扫描线圈的极为迅速的小振幅调制相叠加即可微分波谱，曲线 c。由穿过每次扫描的微波吸收的变化可得到微分波谱。能量转换膜的波谱，曲线d是复杂的。可以从波峰，或波谷，或曲线的拐点来得到g值。样品必须是被冷冻的，一般蛋白浓度较高(10—50mg ml^{-1}蛋白)。

地分布，它的$E_{m,7}$值可以有很大的不同，对叶绿体中的铁氧还蛋白(ferredoxin)来说，低至－430mV(第6.4节)，而对细菌HiPIP(高电位铁硫蛋白，high-potentialiron-sulphur protein)来说，则高达＋360mV(第6.3节)。

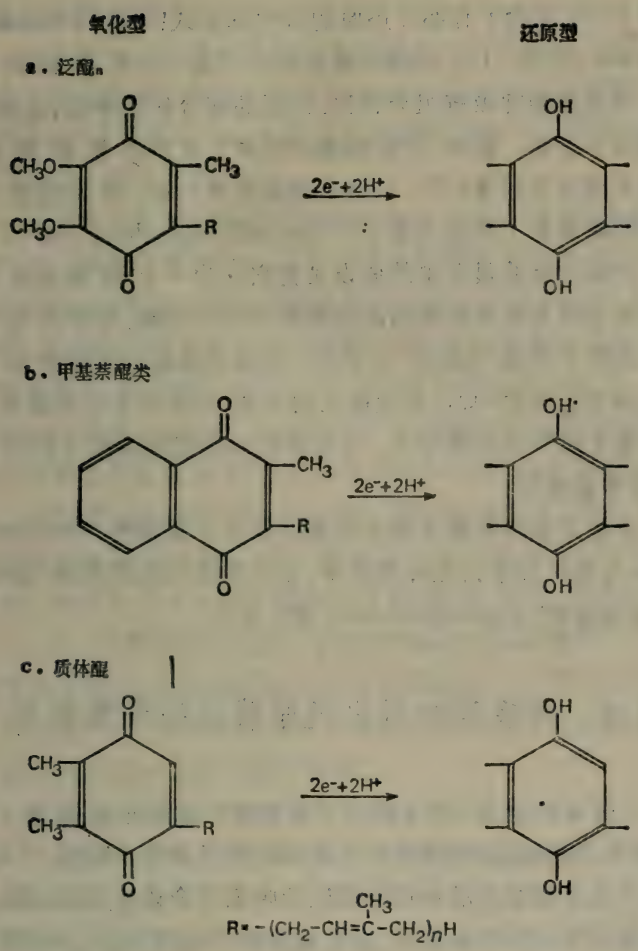


图5.8 泛醌以及有关的氧化还原载体

在哺乳动物中发现的泛醌(辅酶Q、CoQ、UQ或单写成Q)是UQ_{10},它有一条侧链,包含10个5碳的异戊二烯单位(图5.8)这条有50个碳的碳氢化合物侧链使得UQ_{10}呈高度疏水性。经过$2H^+ + 2e^-$还原作用后UQ形成UQH_2(ubiquinol),

同时 EPR 证明了有部分还原的自由基形式 UQH(ubisemiquinone)存在。UQ 在呼吸链中的作用是一个有争议的问题。与其他的呼吸链组分相比，泛醌的部分转换率低，这使得泛醌位于支路。然而，泛醌的量却远高于其他呼吸链组分，而且从通过泛醌库(UQ pool)的总流量上看，将泛醌置于主要代谢途径上是适当的(Kröger和Klingenberg，1973)。关于泛醌功能的最简单的假设是把它作为一个将复合体Ⅰ、Ⅱ与复合体Ⅲ连接起来的活动的氧化还原载体，尽管在复合体Ⅲ的电子传递"Q循环"公式中，假设泛醌起着完整的作用(第5.8节)。虽然UQ_{10}是生理上的介质，但是由于它的疏水特性故难于应用在实验室里，而有着较短侧链的泛醌水溶性很高，常常被使用。

某些无氧呼吸链不使用泛醌而使用甲基萘醌(menaquinone)(第5.12节)，在叶绿体中，相应的氧化还原载体(第6.4节)是质体醌(plastoquinone)(图5.8)。

5.3 呼吸链中氧化还原载体的线性顺序

六十年代初期，由于应用了氧电极技术和光谱技术(第4.5节)，线粒体呼吸链中电子载体的顺序被基本确定了(图5.1)。由于能够在沿呼吸链对应于呼吸复合体连接处的几个部位上注入和引出电子，极大地促进了这项工作。NADH还原复合体Ⅰ，琥珀酸还原复合体Ⅱ，四甲基-p-苯二胺(tetramethyl-p-phenylenediamine, TMPD)还原细胞色素氧化酶(图4.2)。常将抗坏血酸与TMPD一起加入以重新产生还原型的TMPD。铁氰化物是非特异性的，但不能透过膜的电子受体，它不仅能够将呼吸链分割成几个部位，而且还可以

提供有关膜内组分取向的信息(Klingenberg,1979)。

特异性电子传递抑制剂的发现使氧电极可以用于确定电子进入部位及抑制剂作用部位的相对位置(图5.9)。掌握了这些信息,就有可能对与这些部位相关的每个氧化还原载体的定位进行光谱学分析。

通过向无氧的线粒体悬浮液中加入氧以诱发瞬间反应(图5.4),随着研究瞬间反应发生时呼吸链氧化作用动力学技术的进展,对氧化还原组分排布序列的独立的研究也开展了起来。这些组分成为氧化态的顺序,反映了它们与末端氧化酶的接近程度,也反映了它们在电子传递主途径中是否为一个有动力学功能的组分。在这种条件下观测氧化还原反应的迅速性需要应用断流技术(stopped-flow technique)(图5.4)。

呼吸链中的载体势必按这样一种方式排列着,即它们的氧化还原电位 E_h(第3.3节)形成了一个从NADH到O_2的序列。中点电位 E_m 和还原作用的程度决定了 E_h 的大小(式3.19)。尽管在呼吸链中一个组分还原作用的程度可以用光谱法来测定,但为测定原位中点电位需要用间接的方法。必须注意,一个组分在呼吸链上的中点电位与该组分被提纯并被溶解后的中点电位是不同的。

氧化还原电位分析(redox potentiometry)技术(见Dutton和Wilson,1976;Dutton,1978)把双波长光谱与氧化还原电位测定技术结合起来了(第3.3节)。正如大多数生物电偶的氧化还原电位的情况一样,需要加入低浓度的中间氧化还原电偶以加速铂电极与初始电偶间的平衡过程。由于二级中间物只能在其中点电位的范围内有效地起作用(这样会有可观浓度的氧化态与还原态两种中间物),所以需要一组中点电位各相差约100mV的中间物来覆盖呼吸链的全部跨距。所使用的中间物的浓度一般在10^{-6}—10^{-4}mol/L。许多中间

物会自行氧化，因而必须使培养液保持无氧状态，同时还要防止通过呼吸链的净流动打乱平衡。

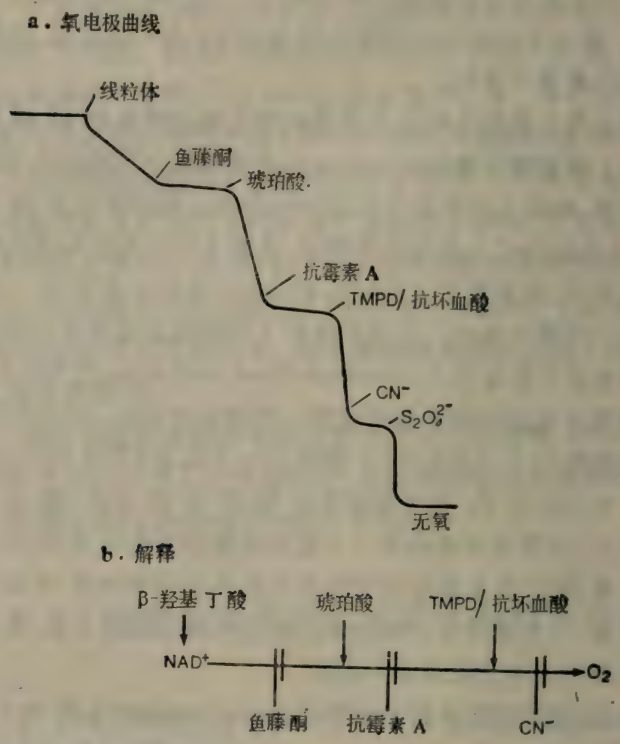


图5.9 确定抑制剂作用部位及电子进入呼吸链的位点的相对位置的典型氧电极实验

将肝线粒体加入到空气饱和的含有FCCP(一种质子移位体，可使线粒体的质子渗透性成为无速度限制的，见第2.5.3节)的介质中。最初存在NAD^+连接的底物β-羟基丁酸。1μmol/L。鱼藤酮即可以完全抑制呼吸作用，但允许琥珀酸随后被氧化。抗霉素A抑制琥珀酸的氧化作用，但并不抑制TMPD和抗坏血酸氧化反应。氰化物抑制这一呼吸作用。加入连二亚硫酸钠盐($S_2O_4^{2-}$)可以诱导非酶促缺氧。

膜结合体系的第二项要求是，这些中间物必须能够透过膜，以便与所有的组分达到平衡。假如所研究的线粒体处于

"能化"状态(即存在 ATP，因为培养液必须是无氧的)，将导致极为复杂的局面。因为 $\Delta\psi$ 和 ΔpH 会影响氧化态或还原态中间物在膜两侧的分布，而且在呼吸链组分处的氧化态中间物与还原态中间物的比例也会与在铂电极处不同。必须把可能的人工效应与真正的效应区分开(见Hinkle和Mitchell, 1970；Walz, 1979)。由于在膜电位的诱导下电子跨膜重新分布，甚至由于 E_m 本身亦会依赖能量发生改变，因此对那些依赖于ATP 的效应的解释非常复杂。故最简单的氧化还原电位测定可以用去能化的线粒体或亚线粒体颗粒来进行。

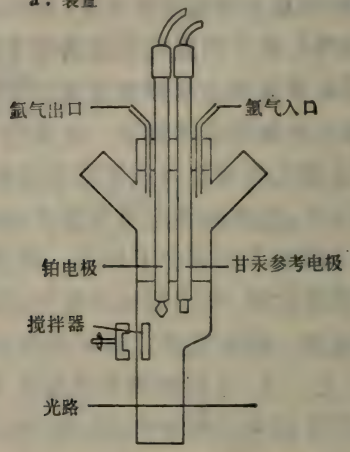
呼吸链组分 E_m 的实际测定是很简明的(图5.10)，线粒体在无氧条件和二级中间物存在下保温。有关组分的还原状态通过分光束光谱来监测，周围环境的氧化还原电位则用铂电极或金电极来监测。电极允许二级中间物与呼吸链组分全都平衡在一个 E_h 上。E_h 可以被调得更为电负性(通过加入抗坏血酸、NADH 或连二亚硫酸盐)；而加入铁氰化物则可以把 E_h 调得更具正电性，该组分的 E_h 和还原程度是同时被监测的。按这种方式就能进行一个组分的氧化还原滴定。

通过这种滴定能够获得许多信息。除中点电位之外，无论这个组分是单电子载体(每十个 60mV)或是二电子载体(每十个30mV)，都可以确定它的log [氧化] / [还原] 的斜率。在不同的pH下重复进行滴定，即可以知道该中点电位是不是依赖于pH的，如果是，就意味着这个组分是一个 $(H^+ + e^-)$ 载体。最后，基于 E_m 的区别，这种技术常能从单一光谱峰中分辨出二个或三个组分。在这种情况下，基础 Nernst曲线(图3.3)歧变而成为两条具有不同 E_m 值的曲线的和，它们随后可以被分辨开。发现复合体 Ⅲ 中的细胞色素b可以被分辨成为两个组分(第5.8节)，乃是利用这一技术所得到的最令人感兴趣的发现之一。氧化还原电位法也可以应用到铁硫蛋白上，这时

组分的氧化还原状态可以用电子自旋共振法（EPR）来监测。

图5.11中列举了呼吸链中可辨认出的组分的中点电位。一旦非呼吸线粒体的 E_m 值被确定，那么只通过测定呼吸线粒体中任何一个组分的还原程度，就能给出该组分的 E_h 值。

a. 装置



b. 琥珀酸-细胞色素 c还原酶复合体（Ⅱ＋Ⅲ）的氧化还原差光谱

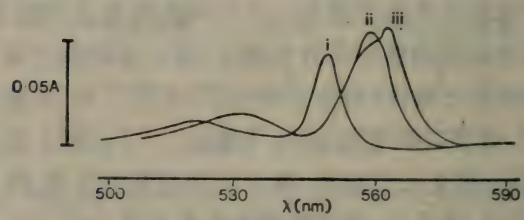


图5.10　测定呼吸链组分的氧化还原电位

a.同时测定氧化还原电位与吸收光谱的装置。b.由琥珀酸盐-细胞色素还原酶(即复合体II＋III)悬浮液所得到的差光谱。在低浓度Triton X-100和脱氧胆酸盐液中的复合体加入到含有氧化还原中间物的无氧培养液中。通过加入铁氰化钾来改变周围的氧化还原电位。i.在＋280mV的参照扫描(基线)，所有细胞色素被氧化。在＋145mV进行第二次扫描(细胞色素c_1处于还原态)。ii.基线在＋145mv(细胞色素c_1被还原)，第二次扫描在－10mV（b_{562}也被还原)，iii.基线在－10mV(c_1和b_{562}被还原)，第二次扫描在－100mV（细胞色素b_{566}也被还原)(数据按，Dutton，1978)。

根据呼吸处于状态 4 的线粒体所得到的结果见表5.11。氧化还原组分分成四个等电位组，组之间的间隔即相应于质子移位作用发生的区域。电子跨越这些间隔的 E_h 降被贮存在质子电化学势中。

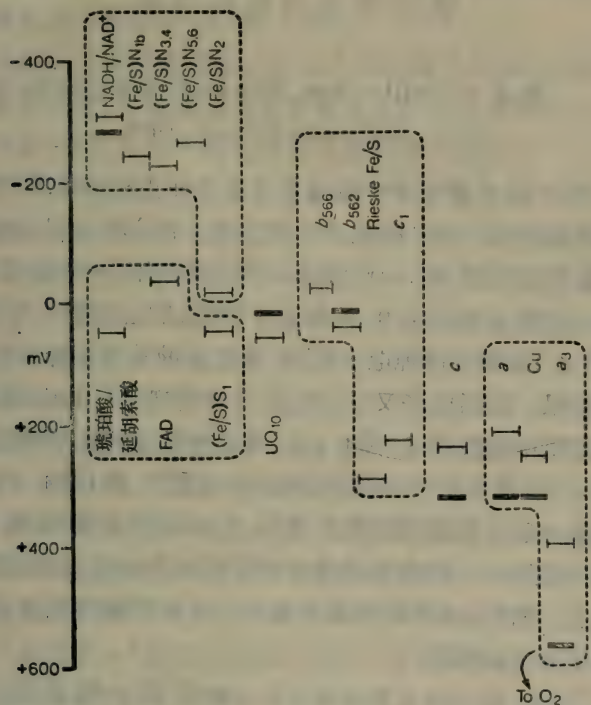


图5.11　线粒体呼吸链组分的 E_m 值以及状态 4 的 E_h 值

这些值是关于心脏线粒体的。——，由去能化线粒体得到的 E_m 值。——，氧化 β-羟基丁酸处于状态4的线粒体的 E_h 值，根据去能化的 E_m 值和处于状态 4 的组分的还原程度计算得出。假定没有中点电位的依赖于能量的变化发生（采用 Erecinska等，1974；Dutton和Wilson，1974的数据）。

5.4 通过呼吸链的质子移位作用；由“回路”模型或“构象泵”模型而来的结构预测

综述 Greville,1969;Mitchell,1976b,1979a;Papa,1976;Wikström和krab,1979

图 4.10 介绍关于呼吸链质子移位作用机制的两个假说，它们都具有 $H^+/2e^-$ 的化学计量关系。由 Mitchell 提出的呼吸链直接回路(direct looped)机制受到了一些有说服力的和经实验证实的压力。按照这个模型，射出的质子是电子从(H^++e^-)载体传向纯电子载体，并在膜的外表面释放质子的直接结果。随后电子又从纯电子载体传向(H^++e^-)载体上，并从基质中吸收质子(图4.10)。可以推断，对每一个循环都存在着一个 $2H^+/2e^-$ 的强制性的化学计量关系(第4.3节)；因而在氧化还原载体的线性序列中，载体必须正确地变换，而且它们必须以一种能够使质子沿所观察方向移位的方式定位在膜上。相反，构象泵则完全是一个不很严格的概念，能适应几乎任何实验观察。

“回路”假说的主要问题是缺乏呼吸链中明显的(H^++e^-)载体的证据。这里只有两个明显的(H^++e^-)载体——复合体 I 中的FMN(第5.6节)和 UQ_{10}，但是却有多至 15 个显而易见的电子载体(8个 Fe/S蛋白，5个细胞色素以及 2 个Cu原子)。对这个问题的解释之一是质子推动的 Q 循环(第5.8节)，在两个回路中，UQ_{10} 实质上起到了(H^++e^-)载体的作用。

有时讲到"回路"假说需要这些回路横穿过膜，而且应当在膜的外表面检测到相应的氧化还原载体。然而，对于一个有功能的回路来说，全部所需乃是一种向膜的外侧释放质子的方式。因而所有的氧化还原载体一定要定位于膜的向基质的表面，由与 ATP 合成酶中 F_0 部分相类似的特异的质子通道来催化质子移位作用(第7.3节)。

虽然把有关呼吸链质子移位作用的理论归纳为回路或者构象泵较方便，但重要的是不要夸大这两个模型间的差别。因此，"回路"假说提出一些氧化与还原载体在还原作用中会改变它们的 pK值，足以从基质中每两个电子结合两个质子，然后在重新氧化时再降低它们的 pK，并把质子释放到外部去。这种 pK值改变及方向性同时也是任何一种"构象泵"模型的性质，唯一的区别是取消了质子与电子必须结合在同一组分上这个限制。代替氧化还原组分不同于与质子结合组分，Gibbs能量成为可获得的了，这是由于氧化还原变化能通过构象改变被传递到第二个组分，这个组分也相应地改变它的 pK 和构象。因为第二个组分可以是一个没有氧化还原性质的肽，所以对可能候补者的选择也不再受限制了。其次，化学计量上的限制也消除了，因为没有理由说明，为什么对应于相关联的氧化还原载体的 $2e^-$ 还原作用而引起的构象改变，三个或多个基团的 pK值也应当是不变的，没有已知的氧化还原载体可结合多于 $2H^+/2e^-$。

一个构象泵必须使氧化还原变化、构象改变和质子化作用的改变协调一致。因此即使是最简单的模型也会有$2^3=8$种假设状态与三维排列的转换作用相对应。如图 5.12 所示，通过限制所允许的转换作用的数目可以迫使质子的定向移位。

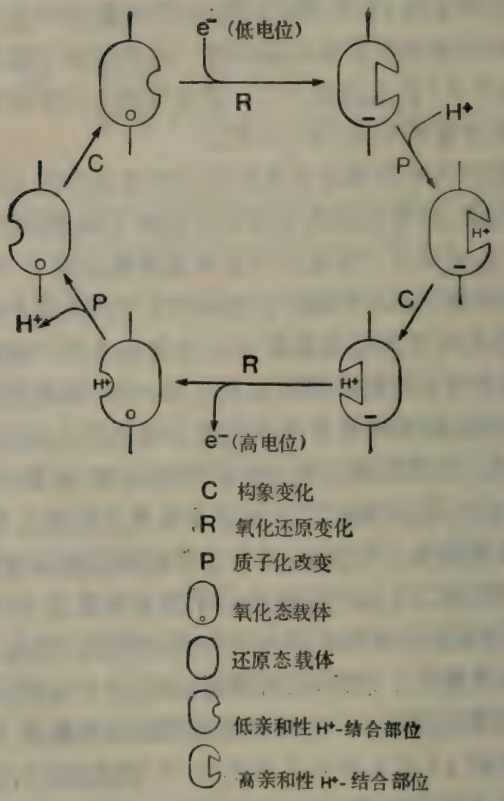


图5.12 氧化还原作用驱动的质子泵模型

这表示一个化学计量为 $1H^{+}/1e^{-}$ 的质子泵的假设模型。泵可以以八种状态存在(由两种构象、两种氧化还原状态和两种质子化状态得到的组合)。为了产生定向的质子运输，在这八种状态之间只允许一定的转变。

5.5 呼吸链复合体的分离与重组

综述 Hatefi,1978;Hatefi等,1962(复合体的制备);Kagawa,1972;Racker,1979(分离与重组)

在低温和低浓度下使用如胆酸盐和去氧胆酸盐等胆汁盐,只会破坏膜中的脂-脂相互作用,肽-肽间的结合仍是完整的。利用这类去垢剂,可以把线粒体呼吸链分成四个复合体,它们被称为复合体Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ(细胞色素c氧化酶)。在此溶解过程中每个复合体都保持着电子传递活性。当这些复合体被重组到人工双分子层膜上时,它们的质子移位活性也得以恢复。分离与重组这些复合体有以下几个目的:(1)减少了完整线粒体的复杂性;(2)有可能确定呼吸链上每个区域表现功能所需组分的最低数量;(3)在化学渗透理论受到检验期间,为了排除在呼吸链与ATP合成酶之间有化学上或者结构上直接联系的必要性,重组被证明是最有说服力的方法之一。例如通过将完全属于不同种类的复合体,象牛心线粒体ATP合成酶与嗜盐菌的先驱动质子泵(第6.6节)结合到同一个双层膜上,证明ATP合成作用是有可能"重组"的。

当线粒体呼吸链被分部分离时,似乎复合体Ⅳ的摩尔数两倍于复合体Ⅲ。复合体Ⅰ和复合体Ⅱ的实际摩尔数则更小。被分离的复合体很易于重新装配到一起。例如在磷脂和UQ_{10}的存在下,复合体Ⅰ和复合体Ⅲ能自动地重新装配起来,恢复NADH-细胞色素c氧化还原酶活性(Ragan和Heron,1978)。

这种重组技术是由Racker和Kagawa首创的。一旦得到了纯净的复合体,就要考虑技术上的问题。首先必须设计一种技术,它能够把复合体重新引入到脂双分子层中去而仍

能保持活性。其次要考虑到重组上的质子泵在膜内无规取向的可能性，这种无规取向会妨碍对(质子)净运输作用的监测。通常是将复合体与磷脂一起悬浮在胆酸盐(溶液)中，然后把去垢剂透析掉，即可(使复合体)嵌入磷脂泡囊(vesicles)。膜中嵌有复合体的磷脂泡囊是自动形成的。另一种方法是将复合体与磷脂一起超声(第1.4节)。

5.6 复合体 I (NADH-UQ氧化还原酶)

综述 Ragan,1976(性质);Hatefi,1978(制备)

复合体 I 催化 2 个电子从 NADH 转移至UQ_{10}，$\Delta E_{h,7}$约为 310mV (图5.11)。该复合体是一个质子移位体，这在用完整线粒体或者用重组的复合体 I 并以氧化态的泛醌作电子受体时都可以显示出来。使用 NAD^+ 结合的底物可获得比使用琥珀酸(盐)为底物时较高的H^+/O比(第4.3节)及ADP/O比(第4.6节)，琥珀酸(盐)可以通过非质子移位体复合体 II 向UQ_{10}传递电子。

复合体 I 的分子量约为850,000D，这大概是内膜上最大的一个蛋白质组分。它至少含有 16 个多肽，大多数并不直接起氧化还原作用。NADH 在内膜面向基质的一侧被含有 FMN 的组份——NADH 脱氢酶所氧化。因此完整的线粒体不能利用外加的 NADH，翻转后的亚线粒体颗粒大概能够利用它们。除 FMN 外，复合体 I 中对应于每摩尔 FMN 还含有 16 到 18 个 Fe 原子和酸不稳定性 S，它们结成 2 到 4 个铁簇 (Fe-cluster)。每摩尔复合体 I 中有 4 到 7 个 Fe/S 中心，它们可以与氧化还原电位一起被低温 EPR 检测到 (图 5.11)。除了具有约−80mV $E_{m,7}$的N-2中心外，其余的中心的中点电位都在−240mV到−380mV间变化。

复合体Ⅰ能被鱼藤酮或是杀粉蝶菌素A(piericidin A)抑制。尽管FMN和所有的Fe/S中心在抑制剂存在时都被还原,抑制作用很可能是发生在电子向UQ_{10}传递的最后一步,但是鱼藤酮的结合部位尚不清楚。

膜不通透的、非特异性的电子受体铁氰化物不能与完整线粒体中的复合体Ⅰ相互作用,但是能在翻转的亚线粒体颗粒中催化迅速的、对鱼藤酮不敏感的氧化作用。

5.7 复合体Ⅱ(琥珀酸脱氢酶);电子传递黄素蛋白以及α-甘油磷酸脱氢酶

综述 Hatefi,1978(制备)

除了复合体Ⅰ之外,还有其他三个氧化还原途径把电子提供给UQ_{10}和复合体Ⅲ。它们是:复合体Ⅱ,它从琥珀酸传递电子;电子传递黄素蛋白,它从脂肪酸β-氧化作用的黄素蛋白相连的步骤提供电子;以及α-甘油磷酸脱氢酶,它催化α-甘油磷酸向磷酸二羟丙酮的线粒体外氧化作用。它们中的前两个定位于内膜的向基质的一侧,另一个则在膜的外表面。所有这三者都是黄素蛋白,都是从中点电位接近0 mV的底物电偶传递电子。正如根据热力学所推断的,它们都不是质子移位体。

复合体Ⅱ由多达4个多肽组成(表5.1)。两个最大的多肽组成了琥珀酸脱氢酶,一个最大的多肽中含有一个共价结合的FAD以及两个Fe/S中心,而另一个最大的多肽中含有另外的中心。复合体Ⅱ含有等摩尔数的细胞色素b与FAD,这里的细胞色素b与复合体Ⅲ(第5.8节)中的不同,它与较小的多肽相连,其功能尚不清楚。

5.8 泛醌与复合体III (bc_1-复合体或UQ-细胞色素c氧化还原酶)

综述 Hatefi,1978(制备);Wikström,1973;Papa,1976;Rieske,1976(性质)

表5.1 线粒体呼吸链中具有功能的复合体

复合体	亚基	辅基	H^+移位功能
I*NADH-UQ还原酶 850kD	16	1FMN 16—24非血红素铁 (5—7个中心)	有
II*琥珀酸-UQ还原酶 94kD	2	1FAD 8非血红素铁 (3个中心)	无
(泛醌) III*UQH_2-细胞色素c还原酶 280kD	6—8	2b型血红素 1c型血红素 7非血红素铁	有
(细胞色素c) IV*细胞色素c氧化酶 200kD	6—7	(1个中心) 2a型血红素 2Cu	有[a]

a. 严格地讲,关于是电子还是质子被移位的问题还有争论(见第5.9节)。

各类细胞色素以接近的定量关系存在,即$b:c_1:c:a:a_3=2:1:2:2:2$。各类复合体间大约的摩尔比是I:II:III:IV=0.1:0.1:0.5:1。

虽然在呼吸链中UQ_{10}是最小的氧化还原组分,但是它的作用却引起了很多争论。这个疏水性辅酶最简单的功能是作为一个"氢库",即是一个从复合体Ⅰ和Ⅱ向复合体Ⅲ传递电子的可移动的($2H^++2e^-$)载体。然而,在"质子推动的Q

循环"(protonmotive-Q cycle)中又提出了,在复合体Ⅲ自身的($H^+ + e^-$)传递中UQ起了不可缺少的作用。

复合体Ⅲ含有8个亚基,包括2分子的细胞色素b和1分子的细胞色素c。在很长一段时间里,人们都以为这两个细胞色素b属于不同种类,因为只有一个细胞色素b可以在加入琥珀酸后被还原,而另一个则需加入连二亚硫酸盐后才能够被还原。此外,无论是在完整的线粒体中还是在被纯化后的复合体中,这两个细胞色素b都显示不同的光谱。最后,这两个细胞色素b具有不同的中点电位,即使在纯化后的细胞色素b双体中它们仍有区别(von Jagow等,1978)。这两个看来不同的种类分别被命名为b_k或b_{562}(单靠琥珀酸即可还原的组分)和b_T或b_{566}(可由连二亚硫酸盐还原的组分)。但是用酵母线粒体进行的遗传学研究表明,这类脱辅基蛋白(apoprotein)是由相同的结构基因编码的,提示在(细胞色素b)双体中有两个结构上相同的亚基。在这种情况下,这两个组分的不同行为可能是由于单体间的相互作用所引起的。

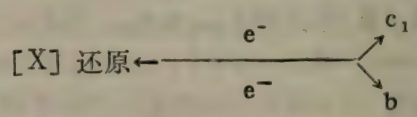
b_{566}和b_{562}的中点电位分别为+30mV和-30mV(图5.11)。这两个组分看来都是很深地埋在膜内,无论是在完整线粒体中还是在翻转后的亚线粒体颗粒中,非特异性电子受体铁氰化物都不能与它们接近。由ATP水解或由K^+扩散产生的膜电位(第3.6节)都会使b_{566}比b_{562}更呈还原性,b_{566}的表观$E_{h,7}$从-40mV增至+70mV。说明这两个组分可能位于膜上相反的位置,而且膜电位会引起电子从基质侧的,b_{562}转移到细胞质侧的b_{566}上去。

除b细胞色素外,复合体Ⅲ还含有细胞色素c_1以及一个强正电性的Fe/S蛋白(Rieske蛋白),它是一个2 Fe/S中心。这个复合体还有几个所谓的核心蛋白(core protein),它们不具有氧化还原功能,但是可以参与质子移位作用。在b细胞

色素与细胞色素 c_1 之间的 E_h 具有高的正电荷，表明在这个区域中的电子流肯定是和 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 的产生密切关联的。

细胞色素 c_1 的分子量为 31,000D，已从牛心线粒体制得纯品。与分离后的制品相比，在原位的细胞色素 c_1 对胰蛋白酶的仰制作用不敏感，这说明它是一个内部蛋白。只有用低温光谱（第5.2节）才可以把细胞色素 c_1 与细胞色素 c 区别开。细胞色素 c 结合于内膜的外表面。但是当膜电位存在时，细胞色素c和 c_1 的相对氧化还原状态有微小的变化，这一点表明 c_1 也朝向外表面。Rieske 蛋白会迅速地与细胞色素 c_1 平衡。

复合体Ⅲ可以被浓度很低的抗霉素A所抑制，事实上是 1mol 的抗霉素 A 抑制 1mol 的复合体Ⅲ。抗霉素 A 的作用部位还不清楚，实际上对于复合体Ⅲ中电子流的全部途径人们也未取得一致的见解。当电子由 UQ 供给复合体时，抑制剂促进b细胞色素的还原作用，却阻止了细胞色素 c_1 的还原。加入如铁氰化物之类的电子受体，不仅会引起所预期的细胞色素 c_1 的氧化作用，而且会引起 b 细胞色素的反常还原，同时加强了膜电位诱导的 b_{566} 和 b_{562} 还原作用之间的歧化。这种奇妙的反应并非依赖于 $\Delta\psi$，而且可以用溶解后的复合体证明（图5.13）。最简单的解释是在此种条件下发生了电子流的歧化作用：



假如在抗霉素A存在时，电子从非特异性供体的传递十分接近平衡，那么 c_1 的氧化作用将使平衡有利于b还原作用。

第二个（$H^+ + e^-$）载体的缺乏以及在抗霉素 A 存在下细胞色素的反常行为，促使 Mitchell 对经典回路（图4.10）作了修正，以利于"质子驱动的Q循环"（Mitchell，1975b）。在"Q循

环"理论中，UQ 通过游离基半醌 UQH（图5.14）经历两阶段氧化作用和还原作用起了不可缺少的作用。半醌极为活泼，它可以迅速地歧化为 UQ 和UQH_2；然而它可以被 EPR 在线粒体中检测到，而且在被保护的环境中看来是稳定的。Q 循环在保留了细胞色素上述立体关系的同时，也考虑到了在抗霉A存在下由于c_1氧化作用而引起的b的异常还原作用。

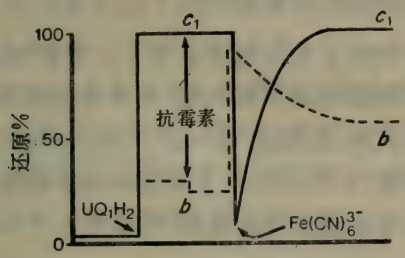


图5.13 抗霉素A和铁氰化物对纯化的复合体III中细胞色素还原作用的影响

纯化的复合体III由去垢剂胆酸盐保持在溶液中，加入UQ_1H_2〔UQH_2(第5.2节)的水溶性类似物〕可以使之还原，二氢醌(quinol)使得全部细胞色素c_1还原，但只能使30%的细胞色素b还原，加入抗霉素只引起稍小的变化。但是当复合体由于加入铁氰化物被氧化时，c_1却成为较多被氧化的，而b则成为较多被还原的组分。由于二氢醌的量超过了铁氰化物，当氧化剂用尽后，这个变化还会反转过来(根据 Rieske，1971改写)。

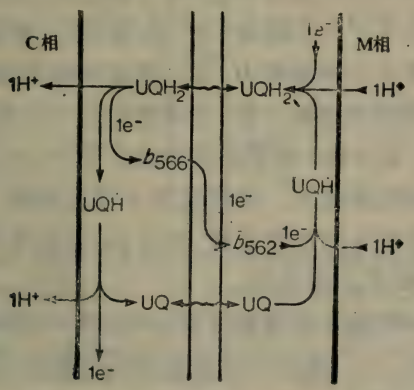


图5.14 质子驱动的"Q"循环(按Mitchell，1975b)

5.9 细胞色素c与复合体IV（细胞色素c氧化酶；亚铁细胞色素；O_2氧化还原酶）

综述 Hatefi,1978(制备);Wikström和Krab,1979(质子移位作用)

复合体Ⅳ把电子传给细胞色素 c。尽管细胞色素 c 可以定量地结合于细胞色素 c 氧化酶,但是它并非作为复合体的一个组份被分离的,细胞色素 c 是一个位于线粒体内膜外表面的一个外周蛋白,很容易从完整线粒体中溶解下来。细胞色素氧化酶是呼吸链末端复合体,它催化一个 $4e^-$ 反应使 O_2 还原成$2H_2O$:

$$4e^- + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 2H_2O$$

细胞色素 c 是天然电子供体。电子也可以由人工合成的电子供体四甲基-p-苯二胺(TMPD)来提供,TMPD 随后可由抗坏血酸还原(第4.1节)。为了适应$4e^-$反应,有四个 1 电子氧化还原基团定位于这个复合体上:两个血红素(细胞色素a和a_3)及两个能够从 Cu^{2+} 还原为 Cu^+ 的铜原子。根据a_3具有结合于 CO 之类配基的特殊能力,可以将这两种细胞色素区别开,尽管也象 b 类细胞色素一样,并不能肯定它们是代表化学上不同的种类。在 b和c 两类细胞色素分子中,铁的非卟啉配位都被氨基酸侧链所占据。细胞色素 a 与之不同,它装配的血红蛋白具一个空余的配位位置,使得 a_3 可以与 O_2 以及抑制剂 CO、CN^-和 N_3^-相结合。

对于处于状态 4 的线粒体,电子以约 +290mV的$E_{h,7}$进入复合体(图5.11),最后在空气饱和的介质中以约+750mV的 $E_{h,7}$被传递到$\frac{1}{2}O_2/H_2O$电偶。因而该氧化还原跨距

$\Delta E_{h,7}$大约为460mV。经过这一电位降的两个电子将足以逆着230mV的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$使4个质子跨膜移位(第3.8节)。虽然已经确认复合体Ⅳ是保存能量的,但是关于它的质子移位作用的化学定量与机制却存在热烈地讨论。与呼吸链上其他复合体不同,细胞色素氧化酶是不可逆转的。

图5.15描述了关于该复合体机制的两种提法。Mitchell最初提出这个复合体代表了最终氧化还原回路的电子传递分支(electron-transferring limb)(图4.10)。与之相反,质子泵模型建议,通过复合体的电子流所引起的构象改变导致质子跨膜移位。虽然在电子传递模型中没有质子的跨膜运输,由于经ATP合成酶进入的质子被用于将O_2还原为H_2O,电子流足以与ATP合成相偶联(图5.15)。

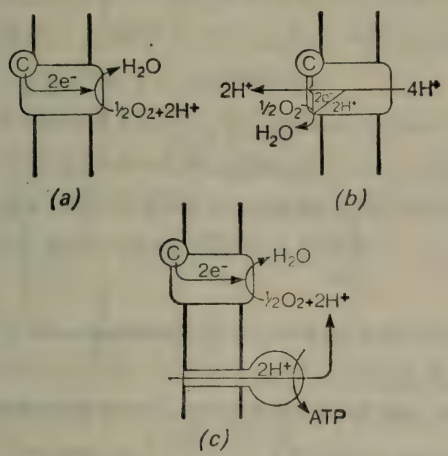


图5.15 细胞色素氧化酶的电子移位模型和质子泵模型

(a)电子移位模型(Mitchell,1966).化学计量关系:$q^+/2e^-=2$;由基质中吸收了$2H^+/2e^-$,没有H^+释放到细胞液中。(b)质子泵模型(Wikström与Krab,1979)$q^+/2e^-=4(6)$;由基质中吸收4(6) $H^+/2e^-$,2(4)$H^+/2e^-$被释放到细胞液中。(c)尽管在模型(a)中没有质子跨膜移位,电子流动也可以与ATP合成作用相偶联。

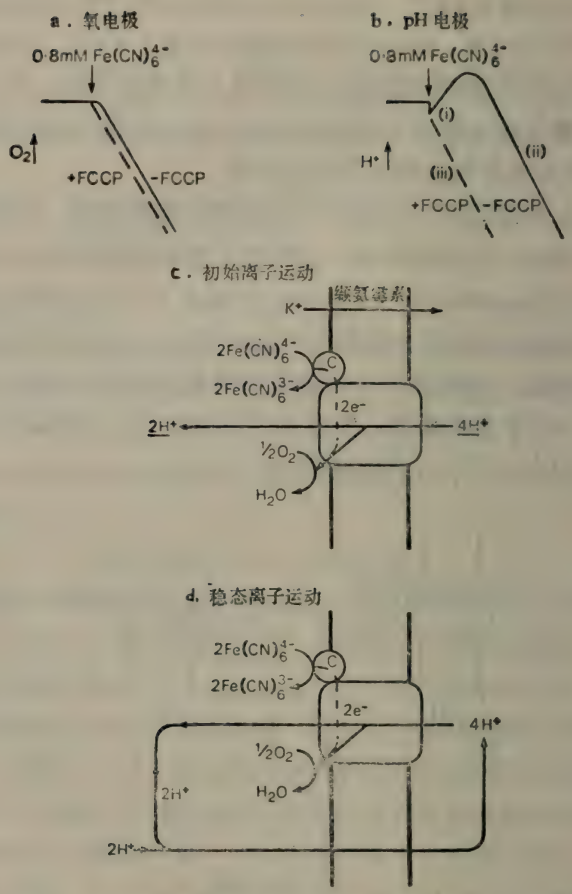


图 5.16 细胞色素氧化酶的质子移位作用将鼠肝线粒体加到低级冲力的含有KCl

(作为渗透支持物)、缬氨霉素(在H+排出作用起始时用于中和电荷)以及鱼藤酮和抗霉素A(以确保在呼吸链的其他部位没有电子传递作用发生)的介质中。加入亚铁氰化物以还原细胞色素 c，随后加入人工制剂(artifact)可以看到介质的酸化作用。(i)因为质子渗回到基质中去，介质转向稳态的碱化。在质子移位体存在下(iii)，只能观察到H+被吸收。(a)氧电极曲线，(b)pH电极曲线，(c) 初始条件，(d)稳态条件(据Wikström和Krab，1978)。

只有质子泵模型导致质子向线粒体外的空间释放(图5.15),这是两个模型最明显的区别。确定是否有这类质子释放发生,看来很简单,实际上却要十分小心以确定任何观察到的质子确实来自向量质子移位作用(vectorial proton trans location)。图5.16给出了这类实验的一个结果,但也请参阅Moyle和Mitchell(1978b)。

5.10 烟酰胺核苷酸转氢酶

综述 Rydström,1977

尽管 $NAD^+/NADH$ 电偶与 $NADP^+/NADPH$ 电偶的中点电位相同,可是后一个电偶在线粒体基质中却总是处于更为还原的状态。这种不平衡状态是由一种能量依赖性转氢酶所维持的,它催化如下反应:

$$NADH+NADP^+ \rightleftharpoons NADPH+NAD^+$$

其质量作用率可超过500,可以由呼吸作用(在这种情况下寡霉素不起作用),或者由ATP水解作用(在这种情况下寡霉素有抑制作用)来维持。说明这种转氢酶依赖于 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$,而不依赖于ATP。

转氢酶含有一条分子量为97,000的主多肽链(Höjeberg和Rydström,1979),它结合于膜上,只对基质的核苷酸起作用,因而可以在翻转的亚线粒体颗粒中研究它们。

通过研究亲脂性阴离子(第2.5节)跨越亚线粒体膜的运动,得到了这些转氢酶参与电荷跨膜运动的证据(图5.17)。对于通过能量转换步骤后必有中点电位差别这一规律(图5.11)来说,该转氢酶是一个有趣的例外。

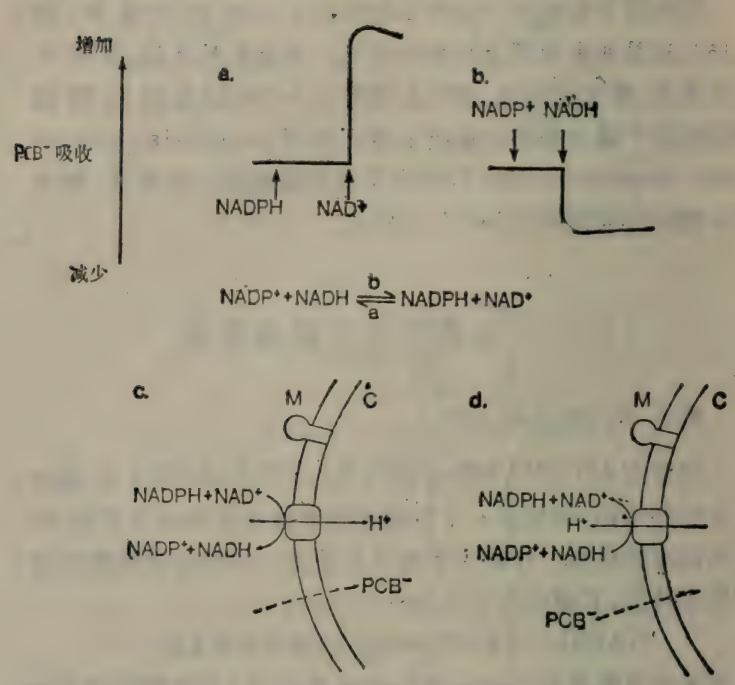


图 5.17 烟酰胺核苷酸转氢酶使电荷跨膜移位

亚线粒体颗粒在有缓冲能力的蔗糖溶液中保温，溶液中含鱼藤酮和 CN^- 以抑制呼吸链。存在 10^{-8} mol/L PCB^-(Phenyldicarbaun decaborane，一种脂溶性阴离子)，用黑脂膜来追踪外部 PCB^- 浓度变化。在 a 中，转氢酶反向运输从M相向C相运输质子，在 b 中，转氢酶将质子转移至 M 相，同时把 $NADP^+$ 还原为 NADPH，在c 和 d 中分别表示了各自的离子运动(根据 Skulachev，1970)。

5.11 植物线粒体的呼吸链

综述 Palmer，1979；Moore与Rich，1980

植物线粒体呼吸链只部分地被 CN^- 所抑制，说明它有另外的末端氧化酶。就从 *Arum maculatum* 成熟的肉穗花序

中分离出来的线粒体来说，其抗氰途径要比常规细胞色素c氧化酶活泼一个数量级(图5.18)。这个末端氧化酶的性质尚不清楚，尽管在不同的时间里人们曾建议它可能是黄素蛋白、可自身氧化的b型细胞色素或是Fe/S蛋白。在疆南星(*Arum*)线粒体中，通向这另一种氧化酶的途径看来是在UQ水平上分支的；例如它对抗霉素A不敏感。由于这另一条途径不使质子移位，故能量转换的效率低。由此产生的生热作用有助于将昆虫引诱剂挥发以帮助花粉传授，这在生理上是重要的。这种生热机制与在哺乳动物褐色脂肪线粒体(第4.5节)演化而成的机制形成有趣的对比，在褐色脂肪线粒体中质子移位作用是正常的，但存在消耗性的质子重新进入作用。

植物线粒体氧化外源性NADH的能力也是有区别的，同时对内源性NADH的氧化作用只部分地被鱼藤酮所抑制。这两个NADH库是由不同的酶来氧化的；外源性NADH的氧化作用可为Ca^{2+}激活，而被外部的AMP或者琥珀酸的氧化作用所抑制。这种外部途径不能使质子移位。

两条通向UQ的途径以及两条由UQ向O_2的途径的存在，提出了这样一种可能性，即有两条完整的途径在工作着，它们是独立的但又通过泛醌库而互相沟通(图5.18)。

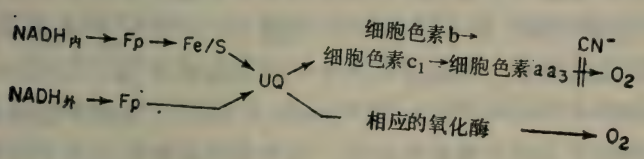


图 5.18 植物线粒体中的电子传递途径

5.12 细菌的呼吸链

综述 Jones, C. W., 1977; Haddock和Jones, 1977; Kröger, 1978; Haddock, 1980

与线粒体相对比，细菌呼吸链显示了额外的三级复杂性。首先，细菌具有不同的电子传递链。第二，为了与其生长条件的改变相呼应，一种细菌也会改变其呼吸链的性质。第三，许多细菌的呼吸链是有分支的，具有通向复合末端电子受体的可供选择的电子传递途径。这种复杂性反映了细菌极大的多方适应性。例如大肠杆菌有一条线性呼吸链，当它在供氧充足条件下生长时，以细胞色素 o 作为末端氧化酶。而在氧有限的条件下，大肠杆菌合成第二个氧化酶细胞色素 d，电子流也分开。在完全无氧的条件下，电子则被传递到硝酸盐或延胡索酸盐。紫色非硫细菌显示了更高的环境适应性，它具有一个在有光线时使用的环形光合成电子传递途径和一个在黑暗处使用的通向 O_2 的呼吸链。一些共同的组份为这两个途径所公有(第6.3节)。

在需氧条件下生长的细菌所使用的氧化还原载体与线粒体所使用的相似，但不完全相同，包括 Fe/S 蛋白、黄素蛋白、泛醌和细胞色素。仅仅在几例中，如脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)(John与Whatley, 1977)，其电子载体的顺序和组分与线粒体非常相似。这种紧密相似性提出了这样一种可能，即线粒体或许起源于副球菌(*Paracoccus*)祖先的内共生作用(endosymbiosis)。

在革兰氏阳性细菌中 UQ为甲基萘醌所取代(图5.8)，而在许多需氧呼吸链中细胞色素 o 或更为抗氰化物的细胞色素

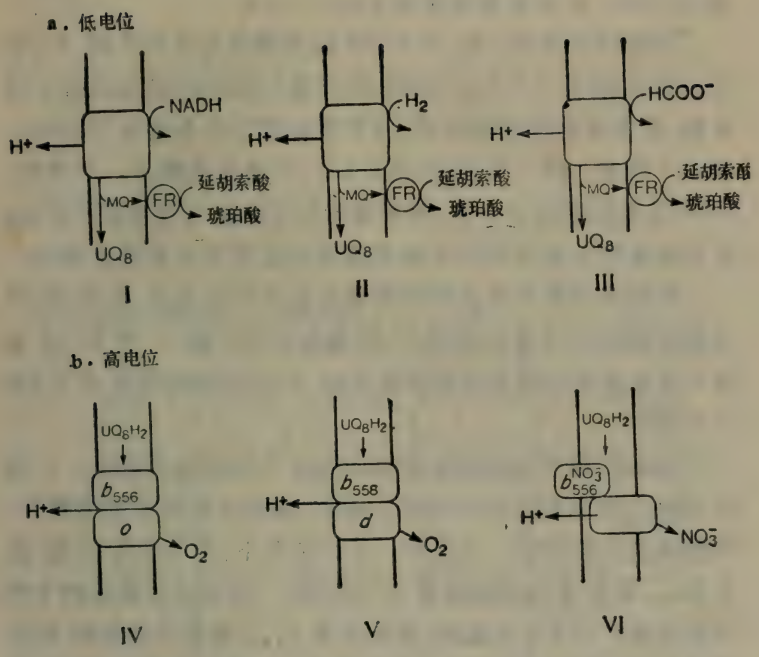


图 5.19 大肠杆菌呼吸链中的质子移位部分

(I)NAD脱氢酶;(II)氢化酶;(III)甲酸脱氢酶;(IV)细胞色素o;(V)细胞色素d;(VI)硝酸盐还原酶。FR,延胡索酸还原酶。无特定的质子化学定量关系(根据Haddock,1980)。

d取代了细胞色素 aa_3 作为末端氧化酶。另一种线粒体呼吸链的共同变化是缺乏高电位的 c 型细胞色素。不能合成细胞色素c的细菌,如大肠杆菌,从泛醌到O_2之间传递较少的质子(图5.19)。

大肠杆菌的质子移位区可被分成低电位部分和高电位部分。低电位部分(见图5.19)在无氧条件下把电子从低电位电偶如 $NAD^+/NADH$、$2H^+/H_2$或$HCOO^-/CO_2$传向甲基萘醌($E'_m=-74mV$),或者在有氧或无氧两种条件下传向泛

醌(是UQ_8,而不是象线粒体中的UQ_{10})。

与在线粒体中一样,NADH脱氢酶含有FMN和Fe/S中心。氢化酶是一个Fe/S蛋白,对其催化部位的定位存在不同见解,假若是在外表面的话,质子移位作用就会成为"Lundegårdh机制"的一个例子(图1.14)。甲酸脱氢酶是一个含钼、Fe/S及血红素的复合体。所有这些脱氢酶都可以使质子移位。在无氧条件下被还原的甲基萘醌可以被延胡索酸重新氧化。

虽然由延胡索酸还原酶所催化的反应仅是由琥珀酸脱氢酶所催化的反应的逆反应,但是在大肠杆菌中,这正、反向两个反应是分别由不同的酶催化的,但这两种酶都含有FAD作为辅基。

大肠杆菌呼吸链高电位部分的电子供体是UQH_2,它随即可被上面讲到的低电位部分还原,也可以被电子供体如D-乳酸或琥珀酸还原。在高O_2压的条件下,电子经过细胞色素b_{556}被传递到细胞色素o,后者是一种可以自氧化的b型细胞色素。当O_2有限时,细胞色素b_{558}把电子传给细胞色素d(它含有部分饱和的二氢卟酚环,代替了卟啉)。在完全无氧并存在NO_3^-的条件下硝酸还原酶被合成,它是一种与特异性的细胞色素$b_{556}^{NO_3^-}$相关联的含钼的Fe/S蛋白(图5.19)。所有这些片段都可以使质子移位。

无机化能营养型细菌利用无机电子供体并且能够在提供CO_2和氮源的完全无机盐介质中生长,其末端电子受体通常是O_2,或很少的情况下为NO_3^-。许多供电子电偶的$E_{m,7}$值都很高,这种细菌的NAD^+还原作用可能是由于反向电子传送而发生的(第4.7节)。氧化亚铁硫杆菌(*Thiobacillus ferrooxidans*)是一个极端的例子,它能够在pH 2利用Fe^{3+}/Fe^{2+}电偶作为电子供体($E_m=+780mV$)电子向O_2的传递已被提出作为"Lundegårdh机制"的另一个例子(第1.4节及图5.20)。

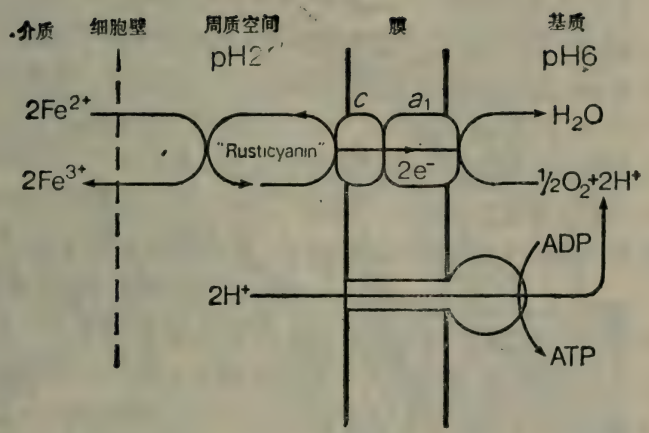


图5.20 在一种无机化能营养型细菌的氧化亚铁硫杆菌(Thiobacillus ferrooxidans中)的氧化磷酸化作用。它在pH2利用Fe^{2+}氧化作用生长，以H_2O作为唯一的能源来生长和固定CO_2。Fe^{2+}/Fe^{3+}电偶的E_m值为+780mV。

为了在暗中形成 ATP，将菠菜叶绿体进行"酸浴"(图4.19)。此时"Z"形非循环电子传递产生 O_2 并向负 E_0 转移电子

6 质子电化学电位的光合发生器

6.1 引　　言

在通过光合成能量转换膜的ATP生成作用中，包括了一个质子回路，它与已讨论过的线粒体中的质子回路非常相似。在两种情况中，跨越质子不通透性膜都可以产生200mV的$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$，它被用来朝着ATP合成的方向驱动质子移位ATP酶。这个ATP酶（或ATP合成酶）除一些细节外与线粒体ATP酶完全相同（第7.2节）。这两个系统的区别当然是它们的$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$初始发生器的性质，在那里也存在着细胞色素、泛醌和Fe/S中心等数种熟悉的组分。

对光合系统来说，两个独特的特征是负责捕获光子的"天线"(antennae）和光能直接作用的反应中心（RC）。在正电位的反应中心接受一个电子，通过吸收光子而成活化态，随后在比原电位低(负)1V的电位下释放出一个电子。光能就以这种方式被直接转换成氧化还原电位能(图6.1)。就光合细菌来说，这种"高能"电子（"energetic"electron）被送进一个电子传递途径中，该途径在利用氧化还原电位能泵出质子的同时，将电子又送回反应中心。

在叶绿体中，这种循环的电子传递改成了一种非循环的途径，它由水中取得电子，电子经过第一个反应中心、电子传递链和第二个反应中心，最后交给$NADP^+$，它的氧化还原电位比$\frac{1}{2}O_2/H_2O$电偶的氧化还原电位低(负)1.1V（图6.1）。叶绿体不仅能完成这一"上向"（uphill）电子传递，同时还产

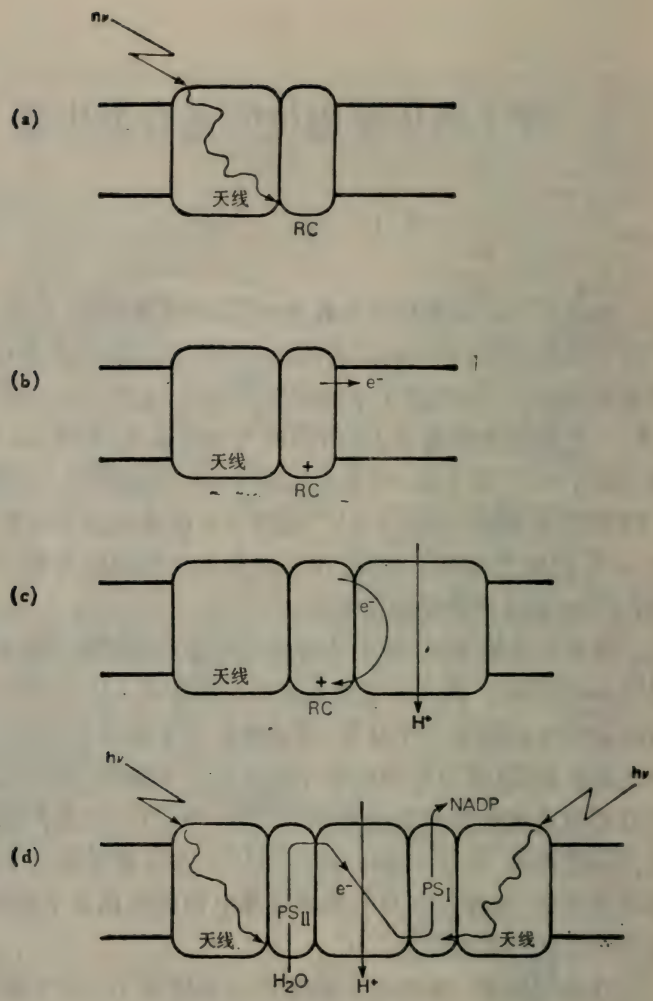


图6.1 光合作用的电子传递

在(a)中,天线吸收光子并将激发能量传给反应中心(RC)。在(b)中,反应中心于负电位下射出一个电子。在细菌中(c),电子经由一个与线粒体复合体III(第5.8节)类似的质子移位复合体又回到反应中心。在叶绿体中(d),电子传递是非循环的。电子由一个反应中心(PSII)自水中获取后,经由一个质子移位电子传递链被送到第二个反应中心(PSI),最终到达NADP+。

生用于ATP合成的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$。ATP和NADPH用于光合作用中固定CO_2的暗反应——Calvin循环中。

6.2 紫色菌的光反应

综述 Parson与Cogdell, 1975; Blankenship和Parson, 1978; Prince和Dutton, 1978

光合生物含有大量色素的膜,起天线的作用,它吸光并将所得能量汇集到特殊的反应中心(RC)里。光子与反应中心的相互作用使得一个组份的中点电位经历一个向负值的大的改变。结果可以把一个电子送给一个电子受体,它的电位比该电子进入反应中心时的电位要低(向负值)1V。一个870nm光子所相应的能量为1.42电子伏特(第3.7节);因此这个能量传递过程是高效率的。

每一个RC都有约30到3,000个"天线"叶绿素(antennae chlorophyll)。如果不能获得仍保持原发光反应而不含天线的纯化反应中心,那么,由于天线色素吸收的干扰会使测试反应中心的光谱变化遇到相当的麻烦。已经从不同的紫色细菌的载色体中提纯出了反应中心(见Gingras; 1978)。该方法包括对膜的去垢剂增溶溶解,继之以常规蛋白质纯化技术。

虽然不同紫色细菌的反应中心在细节上各有不同,但一般来说,它们的分子量约为75,000D,由2或3个多肽及4个分子的细菌叶绿素(Bchl)、2个分子的细菌脱镁叶绿素(Bpheo)、1个铁原子及1个或2个分子的泛醌构成。

反应中心的最初光化学事件是一个Bchl分子二聚体(称为P,经常附上主要吸收带的波长,如P_{870})的E_m发生改变。在非激发态时,P的$E_{m,7}$为+470mV,当二聚体吸收量子而成激发态时,E_m即发生变化。在不到10^{-15}秒之内,P激发为P^*

并引起电子向高能级轨道的跃迁。这本身又使得从P^*失去电子变得容易了，即是说它使得E_m向负值变化。随着从P^*丢失一个电子，所产生的P^+的不成对电子也离开了两个Bchl分子的原位（图6.2）。

这些电子的直接受体是Bpheo分子（"I"）。Bpheo是叶绿体分子中的Mg^{2+}为2个质子取代后的衍生物。电子由P^*向I的传递可以在少于10ps下被检测出来，所产生的$(Bchl)_2^+$……$(Bchl)_2^-$二元基（biradical，被命名为P^F）具有一个特征光谱。在疏水溶剂中对分离出的Bpheo的研究表明，它在反应中心里的E_m约为−550mV，或者说是比处于非激化态的P在电位上低（负）1V（图6.3）。

二元基P^F很不稳定，在200ps内电子就被进一步传给另一个受体"X"，对于*Rhodopseudomonas sphaeroides*（红假单胞近球状菌）来说，X是两个结合的UQ分子中的一个（"UQ_I"）。向UQ中加入一个电子会导致阴离子性的半醌UQ_I^-的形成。UQ_I/UQ_I^-电偶的有效E_m约为−180mV。在UQ_I有时间成为质子化形式的UQ_IH之前，电子会被进一步传送到第二个结合醌UQ_{II}。

所以UQ_I就在氧化型和阴离性半醌形式间振动，总不会被全部还原。相反，UQ_{II}在接受一个电子后，不到400μs即成为质子化的。而且UQ_{II}似乎不能把单个电子传向位于RC之外的UQ本体库中去。它要等待由另一个量子产生的第二个电子把$UQ_{II}H$还原成$UQ_{II}H_2$（第二个质子化作用发生）。这种被充分还原的结合醌能够把$2e^- + 2H^+$传向UQ本体库。因此，这两个结合醌起着2-电子阀门的作用，把单电子光化学事件转化成2电子的传递作用。如将在图6.3中看到的，结合UQ_{II}的质子化作用在$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的生成中起着不可缺少的作用。

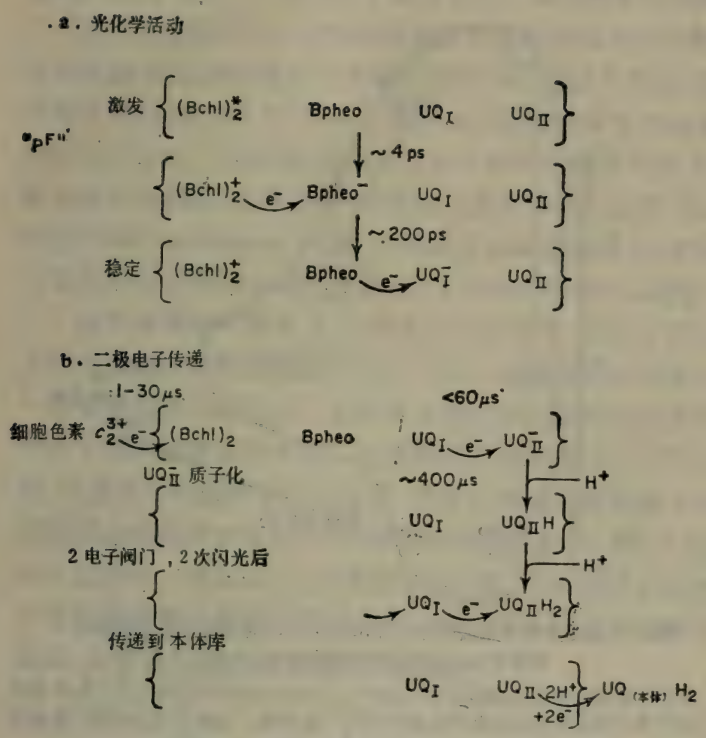


图6.2 在细菌反应中心中电子传递体的线性顺序

但是这类情况都发生在反应中心的受体末端中，所以必须供给反应中心电子，以便为下一个光化学过程做好准备。这是由细胞色素 c_2 完成的，它把一个电子交给 P^+ 以生成 P。经过一个由本体 UQ 回到细胞色素的途径就完成了这一循环电子传递作用。这将在第 6.3 节中予以讨论。初级光化学事件的基本特性是其实际上的不可逆性。由于从 P^* 经过 I 向 X 的电势降，电子从 X^- 向 P^+ 反向传递要比正向反应至少慢 10^4 倍。这就是它产生理想的量子产率，即1个质子导致一个低

电位电子的原因。

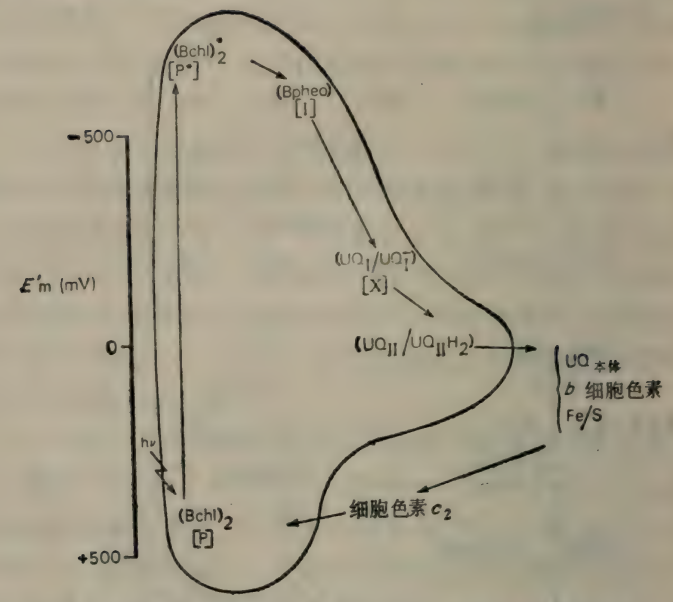


图6.3 球形红假单胞菌(*Rps.sphaeroides*)的反应中心及中间物的中点电位(按Dutton和Prince, 1978)

必须注意通过氧化还原电位法(redox potentiometry,第5.2节)所得到的平衡值在RC的极其迅速的电子传递中并不一定适用。例如 UQ_I/UQ_I^- 电偶仅在ns(纳秒)时间级别的光反应中是稳定的。

6.3 紫色菌中$\Delta\tilde{\mu}_{H+}$的产生

综述 Gromet-Elhanan, 1977; Jones, O.T.G., 1977; Dutton与Prince, 1978; Wraight等, 1978

类胡萝卜素(carotenoids)是一类很不均一的、长链的、多为脂肪族的色素,存在于叶绿体和光合细菌中。已经鉴别了超过350种不同的(属于类胡萝卜素的)化合物。这类分子的共同特点是,分子的中心疏水区具有共轭双键,它允许电子不

受限制地离位并赋予类胡萝卜素以特征可见光光谱。类胡萝卜素最有用的性质是，它们能够响应能量转换膜内产生的极高的电场，其光谱位移为几个纳米(图6.4)。必须考虑到，跨越厚度为10nm膜的仅为100mV的膜电位就意味着平均电场强度为$10^5 Vcm^{-1}$。吸收带的位移并非只限于类胡萝卜素，叶绿素也有较小程度的(吸收带)位移可以被检测到。这种"电色"效应(electrochromic effect)并非只出现在细菌中，实际上该效应是在叶绿体中最先被描述的(Junge与Witt，1968)。

虽然类胡萝卜素不是光合过程所必需的，但是它们对光合膜的曝光反应极其迅速(少于20ns)，这表明它们与膜中的一些初始电荷转移有关。类胡萝卜素响应的起始相确实与电子从$P^{\bullet}$向X的转移有关系。这意味着初始光化学反应是生电的，即是说与跨膜传递电荷有关。尽管应当记住类胡萝卜素只检测膜内部的局部电场，它与本体相跨膜电位差(第3.6节)并不一定相同。在黑暗中，在缬氨霉素存在下，通过K^+扩散电位产生的类胡萝卜素吸收带的位移与在光照下产生的位移方向相同，此时载色体内部空间为正电性。

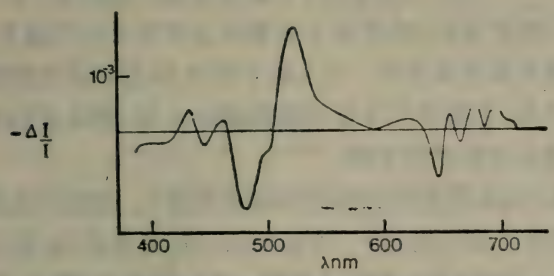


图6.4 叶绿体中光诱导的电色吸收变化(据Junge，1977)

标绘出的是色素吸收光谱中由光诱导红移所产生的差光谱(第5.2节)。在518nm处的大吸收峰主要是由类胡萝卜素引起的，故称为类胡萝卜素带位移。

大量证据表明RC是插进膜中的(图6.5)。P的直接(电子)供体细胞色素c_2定位于载色体膜的内侧表面，相当于完

整细菌中膜的周质面(periplasmic face)(第1.4节),通过消化细胞壁可以从完整的细菌中释放出来。相反,当UQ_{II}成为还原态时所吸收的质子(第6.2节)则是从载色体制剂外部介质中获取的(图6.5)。

除了检测电子由P向X的传递外,通过类胡萝卜素带的位移还可以检测另两个生电步骤。一个与电子从细胞色素c_2向P的传递有关,另一个则与由UQ_I返回细胞色素c_2途径中所涉及的反应有关(见后)。

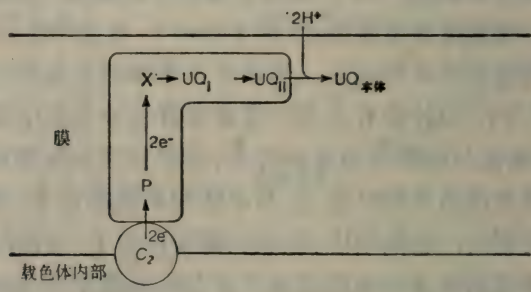


图6.5 细菌反应中心在膜上的排布

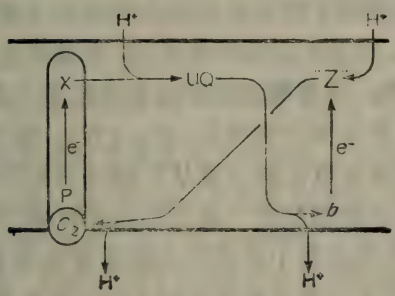
经过一次光照后,类胡萝卜素带的位移随时间而消失,这与质子跨膜重新平衡有关,加入质子移位体会显著地加速这个过程。因此,尽管胡萝卜素只探测膜的局部,但是它们也反映了本体相电位梯度的下降。

电子从UQ总相库反转传递到细胞色素c_2的途径是有争议的。在球形红假单胞菌中,有效的氧化还原载体包括3个Fe/S蛋白,2个或3个b型细胞色素,可以根据它们的E_m,7来鉴别(分别是-90mV,+50mV和+15mV)。任何途径都必须与两项观察一致。第一,在颉氨霉素存在下(减缓$\Delta\psi$的建立),在重复的单一周转闪光(repetitive single turnover flashes)过程中应能观察到载色体对质子的吸收具$2H^+/e^-$

的化学定量关系。第二，分析对相应于单一周转闪光的类胡萝卜素带位移能揭示第三个缓慢生电组份。根据线粒体的情况(第5.8节)类推该组分对抗霉素 A 的敏感性表明涉及 b 型细胞色素。这些观察并不符合于完全循环的电子流动的最简单途径、UQH_2的跨膜扩散以及细胞色素c_2被进入载色体内部的质子所直接还原。因为这一假设途径将不包括缓慢生电步骤而且 H^+/e^- 比率是 1 。它还是低效率的：UQ 和细胞色素 c_2 间的氧化还原降可以适合于第二个"能量转换"(如质子移位)步骤。

有效的氧化还原载体与存在于线粒体质子移位复合体Ⅲ(第5.8节)中的载体极为相似。如同线粒体系统一样，问题是没有足够的明显的 ($H^+ + e^-$) 载体传递质子，故提出了"Q 循环"(第5.8节)，它包括假设的($H^+ + e^-$)载体"Z"以及UQ本体库通过半醌 (semiquinone) 的两步还原作用(图6.6)。必须强调，图 6.6 中所示的两个模型都不能完美地解释所有的数据，真正的途径尚未确立。

a."第二回路"图解，包括($H^+ + e^-$)载体"Z"(见Wraight等，1978)



b "Q-循环"图解(见 Dutton 和 Prince, 1978)

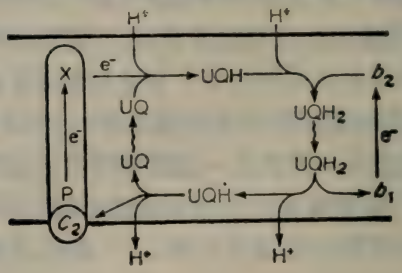


图6.6 紫色菌中的可能的质子移位电子传递途径

循环电子传递产生 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 却并不引起生物合成当量的减少。在紫色硫细菌中，这些电子是从 H_2S 或 $S_2O_3^{2-}$ 之类电子供体处得来的，而在非硫紫色菌中供体则包括苹果酸和琥珀酸。由于通过循环电子传递途径的组份得到的氧化还原电位都大于(处于正电位) $NAD(P)^+/NAD(P)H$ 电偶，烟酰胺核苷酸不能被直接电子流还原，正如叶绿体中的情况一样(第6.4节)。代之以涉及依赖于 $\Delta\bar{\mu}_{H^+}$ 的反转的电子传递(第4.7节)(图6.7)。

Rhodospirillacae 的大多数成员可以在黑暗中于有氧情况下生长，氧抑制了细菌叶绿体和类胡萝卜素的合成，因此没有反应中心。但是b型细胞色素与c型细胞色素还存在，诱导了末端氧化酶。这种酶在球形红假单胞菌中是含铜蛋白质，与线粒体的复合体Ⅳ很相似(第5.9节)。通过利用已存在的细胞色素、诱导的氧化酶以及从泛醌向 NAD(P)H 的逆向电子途径，细菌就能够装配一条完整的呼吸链(图6.7)。这样便可以解释在光合成电子传递与线粒体复合体Ⅲ的氧化还原载体间的相似性了。通过在体外加入反应中心和天线复合体，可以把循环光合成电子传递重组到需氧生长的细胞上。

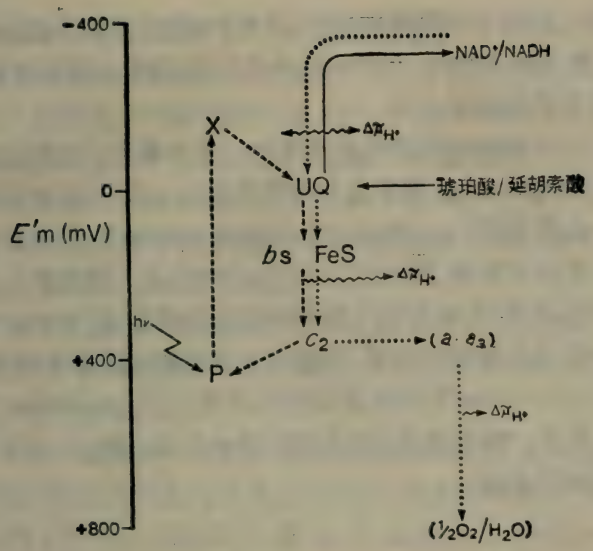


图6.7 球形红假单胞菌中的电子传递途径

…→循环电子传递时的电子流。——→依赖于$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$的从琥珀酸向$NADH^+$的电子传递。…→诱导末端氧化酶后的需氧呼吸链。没有试图解释b细胞色素区域的电子流，画的是简化的图示。

6.4 叶绿体中的电子传递途径

综述 Hill, 1965; Trebst, 1976; Crofts与Wood, 1977; Hauska与Trebst, 1977; Junge, 1977; Blankenship与Parsons, 1978; Witt, 1979

叶绿体的光合电子传递与紫色细菌相比有两方面不同：（1）它是非循环的，产生一个化学定量的H_2O的氧化与$NADP^+$的还原；（2）两个独立的光反应连续作用以完成从$H_2O/\frac{1}{2}O_2$到$NADP^+/NADPH$间的氧化还原跨距(图6.1)。

在一个膜上存在两个反应中心妨碍了对它们的纯化，而

这本身又意味着只能从完整的、只有1%的色素涉及光合成反应（不象天线中那样，Bennett，1979）的类囊体膜取得信息，故需要高灵敏度的技术。

电子传递途径归纳在图 6.8 中。光合系统 I 的初始电子供体被称为P_{700}，它看来是个与细菌的P_{870}很相似的 Chl-α双体。未激发的P_{700}的中点电位约为＋450mV，激发时其中点电位变得更负些（图6.9），并放出一个电子。类胡萝卜素带位移（第6.3节）是最先在叶绿体中被检测到的，它表示在少于20ns 中电子即被传送过膜。初始电子受体的性质尚不清楚，但是$E_{m,7}$为－530mV 的结合态铁氧还蛋白（ferredoxin）被迅速地还原了。电子传递到$NADP^+$是由铁氧还蛋白-$NADP^+$还原酶来完成的。

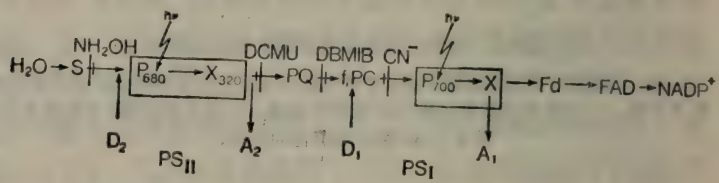


图6.8　叶绿体中电子传递的线性顺序

电子传递抑制剂：NH_2OH、DCMU（N-二氯苯基-N'-二甲基脲）、DBMIB（二溴甲基-异丙基-P苯醌）和CN^-在所标明的地方起作用。D_2：光合系统II的供体（如联苯胺，儿茶酚）。A_2：光合系统II的受体〔如氰铁氰化物，硅钼酸盐，苯二胺，苯醌，DAD(diaminodurane)〕。D_1：光合系统 I 的供体（如还原型苯二胺，$DPIPH_2$（还原型2，6-二氯苯酚靛酚）。A_1：光合系统I的受体，如亚铁氰化物，$NADP^+$，MV（methylviologen），AQ（蒽醌-2-硫酸盐）（据Hauska 与 Trebst，1977）。

在200μs内，初始供体P_{700}^+被一个E_m为 370mV的$2e^-$受体Cu蛋白质体花青（plastocyanine，PC）重新还原。细胞色素f在这一过程中的作用是有争议的。

光合系统 II 具有从H_2O（$H_2O/\frac{1}{2}H_2O$ $E_{m,7}$＝＋870mV）

中摄取电子的非凡能力。PS_{II}的初始电子供体被称为P_{680}，可能是Chl-α。正如PS_I的情况一样，电场在不到20ns内即形成。初始电子受体是质体醌(plastoquinone)X_{320}，它类似细菌系统中的UQ_I，在完全氧化态与半醌阴离子态(PQ^-)之间变换着。如同细菌的反应中心一样，第二个结合的PQ可能在释放电子到本体库前起$2e^-$换能器的作用。在P_{680}和X_{320}之间尚未检测到中间物。

对PS_{II}来说，最终的电子供体是H_2O。人们假设一个被命名为"S"的酶系在将$2H_2O$氧化为$O_2+2H^++4e^-$之前先失去4个电子交给P_{680}。

PS_I与还原PS_I的质体花青间的联系通过PQ本体库而形成，这个库不仅充当光合成系统间的"电子缓冲体系"，还可能充当将$2H^+/2e^-$传递进类囊体空间的Mitchellian H臂(Mitchellian H-limb)(图6.10)。

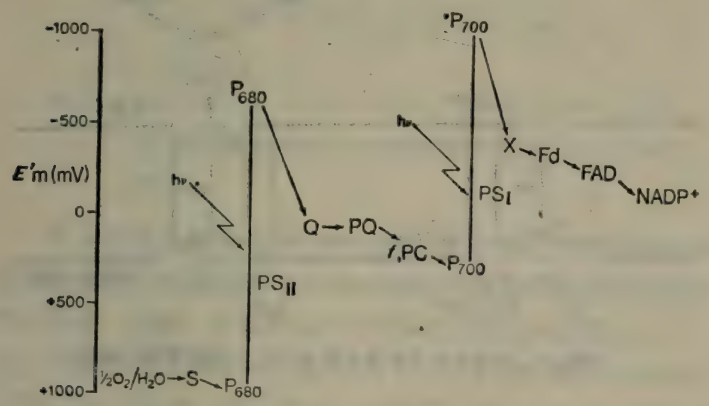


图6.9 叶绿体中与氧化还原电位有关的电子传递

和线粒体复合体Ⅲ(第5.8节)以及紫色菌中的电子传递的情况一样，这类醌的不很明确的作用已经被提出(见Hau-

ska与Trebst,1977),包括UQ及b型细胞色素在类似于线粒体Q循环(第5.8节)中的复杂情况。

类胡萝卜素的响应表明了这两个光合成系统都是跨膜取向的。在光照期间,在类囊体空间积聚亲脂阴离子(第2.5.4节)的能力意味着光合成系统向外传送电子,而在类囊体内产生正电位。关于PS_{II}取向的进一步证据来自对H_2O裂解过程中释放质子的观察,仅在加入质子移位体时才能在介质中检测到释放出的质子,这说明水还原作用是在膜内测发生的。而X_{320}一定要很靠近外膜,因为这样在经过短暂的胰蛋白酶处理后就使得象铁氰化物之类非渗透性的电子受体成为可接近的了。外加抗体可以接近铁氧还蛋白以及铁氧还蛋白-$NADP^+$-还原酶,表明PS_I有同样的取向(图6.10)。

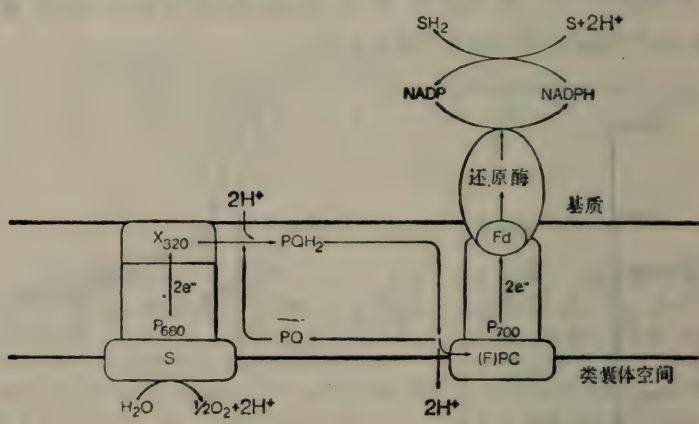


图6.10 叶绿体电子载体在膜上的定位(根据Witt,1979)

在叶绿体中天然的电子传递途径是非循环的,但是可以用如吩嗪硫酸甲酯(PMS)之类的试剂引发人工的循环电子传递。PMS能够既作PS_I的供体,又作PS_I的受体,它先在

(膜)外侧被PS_I还原,扩散通过膜后再在内侧把电子还给PS_I。假如这个试剂是($H^+ + e^-$)载体的话,就创造了一个可以导致循环光合磷酸化的人工回路(图6.11)。

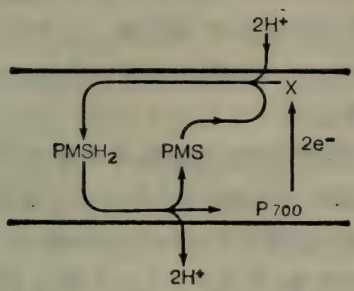


图6.11 叶绿体中的人工质子移位循环电子传递. PMS, $PMSH_2$,氧化态与还原态的N-甲基-吩嗪硫酸甲酯.

6.5 叶绿体中的质子回路

综述 Jagendorf, 1975; Trebst, 1976; Avron, 1977; 1978; Hauska与Trebst, 1977; Reeves与Hall. 1978

电子传递途径与ATP合成酶的取向(第1.3节)表明,叶绿体中的质子回路是以和完整线粒体中的质子回路相反的方式工作的。因此,被膜破损的叶绿体在光照时会吸收质子。由光反应得到的初始$\Delta\psi$,由于Mg^{2+}(在完整叶绿体中)或Cl^-(在破损的系统中)跨越类囊体膜重新分布(图4.8),会在几秒钟的时间过程中被转换成ΔpH。正如通过放射性标记胺的积累,或是通过9-氨基吖啶荧光淬灭所估计到的,在稳态下ΔpH可超过3个pH单位。这种瞬间$\Delta\psi$衰减太迅速了,以至

不能通过放射性标记的阴离子分布检测到，但是能够由类胡萝卜素带位移的衰减来追踪。

在光照下的初始质子运动能够借助如中性红（neutral red）一类pH敏感染料，用分光光度法来监测。尽管电子从PS_{II}向PQ的传递可在2ms内完成，但是质子从介质中消失的时间常数是60ms，这表明在类囊体外侧存在着对质子一定的扩散限制障碍。

与线粒体的情况类似，确定叶绿体中的$H^+/2e^-$比率有许多问题，因此在论文中也缺乏这方面的一致性。"Z"图示（图6.1和6.10）断言，随着每2个电子被传递，由于水的光解作用会在类囊体空间出现2个质子，又由于形成PQH_2会有2个质子从介质中消失。与PS_I相关联的化学计量是依赖于末端受体的性质。就（$2H^+ + 2e^-$）受体来说，2个质子从介质中消失（图6.10）；对天然受体$NADP^+$（一个（$1H^+/2e^-$）受体）的按化学计量关系的还原作用导致1个质子被吸收，而纯电子受体如铁氰化物则不引起质子吸收。在每种情况下都会由于PQH_2的重新氧化而有2个质子出现在类囊体空间（图6.10）。

叶绿体ATP合成酶（第7.2节）与线粒体中的酶相似，当外加$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$使潜伏酶活化以后（第7.2节）在暗处可以观察到依赖于ATP的H^+-吸收。正如其他系统一样，关于H^+/ATP的化学计量存在异议，2和3都被引用过（见Hauska与Trebst，1977）。

6.6 细菌视紫红质与嗜盐菌的紫色膜

综述 Henderson与Unwin，1975；Stoekenius，1976；Stoekenius等，1979；Eisenbach与Caplan，1977，1979

嗜盐菌极其亲盐，其生长需要很高浓度的 NaCl 和 Mg^{2+} 盐，因而它们能在盐湖里繁衍。被研究得最多的是盐生盐杆菌(*Halobacterium halobium*)。当这种细菌在有氧条件下生长时，使用常规呼吸链；但是当它们在光照和低氧压下生长时，它们就在其膜上合成紫色的斑块，降低介质的渗透压(osmolarity)可将其分离出来；当细胞膜残片破损时，这些紫色的斑块仍然保持完整。这种紫色膜由一些扁平的薄片组成，这些薄片由单一蛋白质——细菌视紫红质构成的六边晶体阵，占膜干重的75%左右，其余则是磷脂。该蛋白质由一个分子量为26,000D的单个肽链所组成，其颜色是由与赖氨酸侧链共价结合形成希夫碱(Schiff base)的视黄醛(retinal)分子所引起的(图6.12)。紫色膜中细菌视紫红质的二维排列使得非常精细的像重组技术(image reconstruction techniques)能够应用到膜的电子显微图上去，从而确定了其7Å分辨率的三维结构。这个蛋白质卷曲成7个α螺旋区，每个均穿过膜(图6.13)。

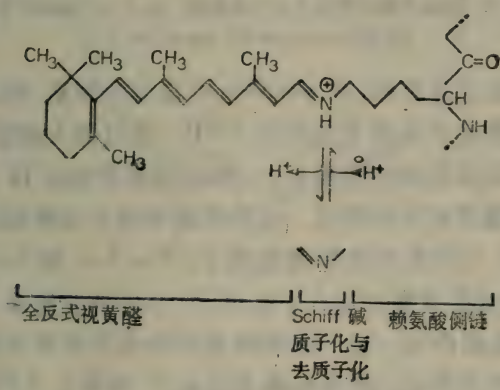


图 6.12 细菌视紫红质的视黄醛发色团

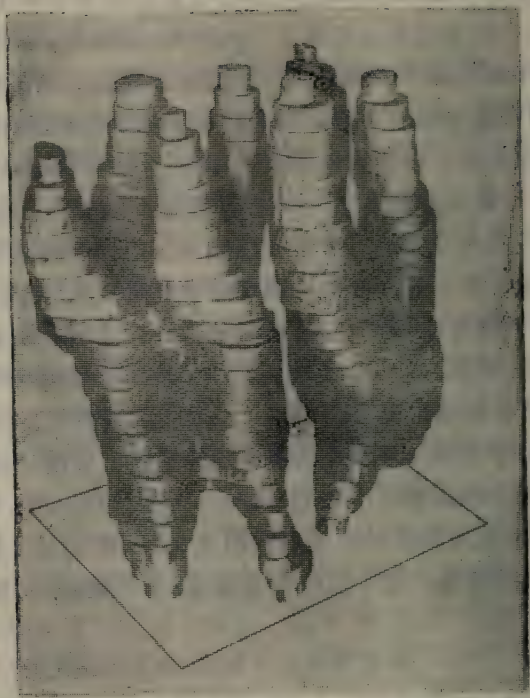


图 6.13 细菌视紫红质单个分子的模型，从平行于膜的角度观察
(根据Henderson与Unwin, 1975)

虽然盐生盐杆菌(*H. halobium*)没有叶绿素，但是它的细胞能够利用光放出质子并合成 ATP。通过加入磷脂，紫色膜能够被重组到封闭的微囊上去，所以容易显示出 H^+-移位是由于细菌视紫红质的作用。这些微囊相对于完整细胞来说是内翻外的，它们在光照时吸收质子。Racker 和 Stoekenius (1974) 向这些微囊中加入牛心 ATP 合成酶并诱导了依赖光的 ATP 合成作用。这一演示的重要性在于很难以任何直接偶联机制来解释它，因为细菌视紫红质和牛心 ATP 合成酶在那一时刻以前从未相遇过，所以它们未必能够直接相互作

用。

细菌视紫红质是最简单的质子泵。它不同于那些H^+-移位与电子传递不相关联的光驱动质子泵或呼吸链质子泵。这个色素的光化学反应是复杂的(图6.14)，尚未被完全解释清楚。在光照时该色素被脱色，同时质子从膜的细胞外侧面被有方向地释放出来。这种色素的脱色的形式被记为"M"，然后随着从细胞内吸收质子又重新生成紫色色素。用低温光谱和激光闪烁光谱可以分辨出许多另外的光谱上的中间物。迄今为止，所知道的经历了可逆的质子化与去质子化作用的唯一的基团是连接视黄醛与蛋白质的希夫碱(图6.12)。它在原初的色素中本是质子化的，但在"M"形式的色素中是去质子化的。

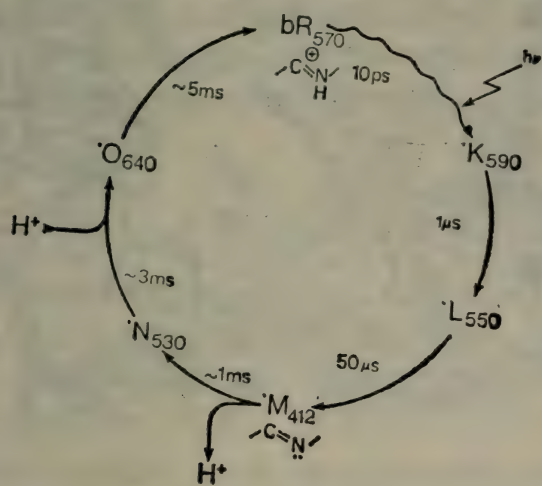
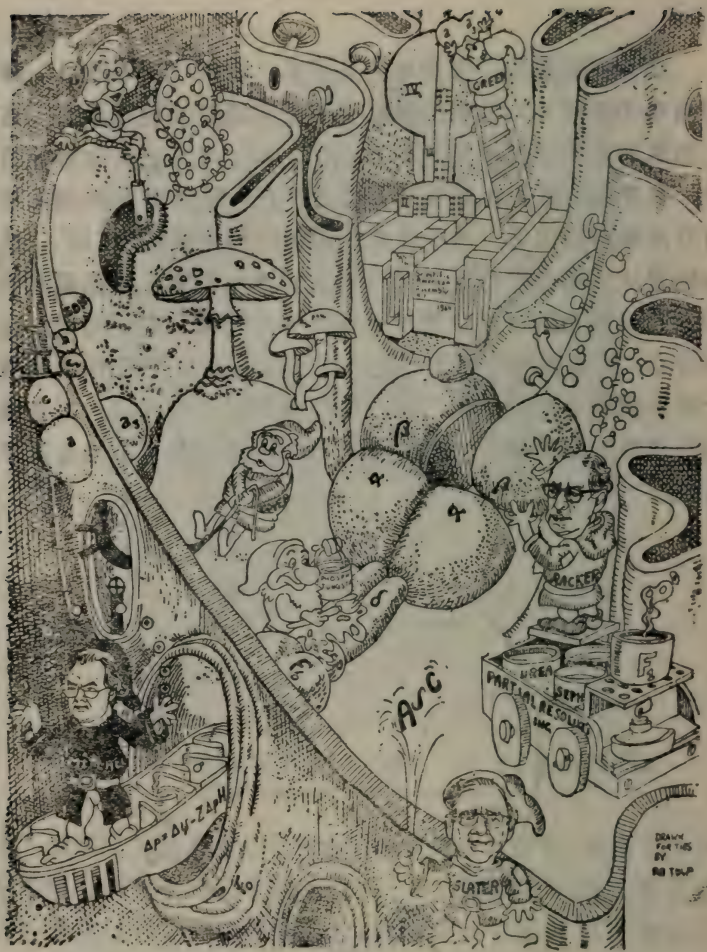


图 6.14 细菌视紫红质的光反应循环
(根据Stoekenius等，1979)



Racker组装对冷不稳定的 F_1-ATP 合成酶(用磷钨酸负染), Mitchell 则使出质子和电荷的高招, Sldter 企图抓住难以捉摸的 A～C, Boyer 引出一种构象变化

7 ATP合成酶

7.1 引 言

ATP合成酶是能量转换膜的共同特征。它存在于线粒体、叶绿体以及好氧的和光合成的两种细菌中，甚至在那些缺少有功能的呼吸链而依赖于糖酵解的细菌中也存在（第4.7节）。在上述各类膜中该复合体的结构都很相似，但是不同于其他的水解ATP的离子泵，例如真核细胞质膜的($Na^+ + K^+$)激活的ATP酶，或是在肌质网中积累Ca^{2+}的Ca^{2+}-ATP酶。在每种情况下ATP合成酶的功能都是相同的——利用$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$以保持ATP酶反应的质量-作用率至少离开平衡点七个数量级大小，对于发酵的细菌来说则是利用ATP以维持$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$用于运输。

7.2 ATP合成酶的结构

综述 Senior, 1973; Pedersen, 1975; Racker, 1975, 1976; Penefsky, 1979（线粒体）; Nelson, 1976; Junge, 1977; Shavit, 1980(叶绿体); Kagawa, 1978; Downie等, 1979（原核生物）

在电子显微镜下，在用磷钨酸盐负染过的能量转换膜制剂上可以观察到ATP合成酶。这个复合体看起来象个球形突出物或象个磨菇凸出在膜的一侧。这个球形突出物的方向性颇具特色：在细菌和线粒体中它们伸到基质或内部空间里；在分离出的类囊体膜、色素细胞或超声过的亚线粒体颗粒中，

它们则是伸向外面的。在两种情况下，这种结构上及功能上的方向性都是相对应的：ATP 总是在膜的有球形突出物伸出的一侧被水解或者被合成，而在 ATP 合成时，质子则是从膜的没有球形突出物的那一侧通过的(图1.1)。

ATP合成酶复合体至少含有9个不同的多肽，其中有些是以多拷贝存在。了解各个组份的作用是这一领域的中心问题。该复合体可以被认为分成两部分：在电子显微镜下看到的这个"球状突出物"相当于ATP 合成酶的催化部分，在线粒体中被称为 F_1，在叶绿体中被称为 CF_1，而在耐热菌中则被称为 TF_1；ATP 合成酶其余的部分由疏水蛋白构成，它们埋在膜里，看来负责通过膜向F_1运输质子。疏水蛋白被称作 F_0。

通过尿素、螯合剂或是低离子强度的不同处理，能够把 F_1从F_0上，也即是从膜上拆离下来。分离后的 F_1 是水溶性的，分子量约为 360kD。F_1 能够被分解成 5 个(有时为 6 个)不同的多肽 (图 7.1)。不同来源的制剂具有十分相似的亚基组成，由 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳计算出的表观分子量(图7.1)为 56kD(α 亚基)，53kD(β亚基)，33kD(γ亚基)，16kD(δ 亚基)，11kD(ε亚基)。对每个亚基究竟存在多少个副本尚有争议，提出了两种组成方式，即 $\alpha_2\beta_2\gamma_2\delta_{1-2}\varepsilon_2$或$\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$。

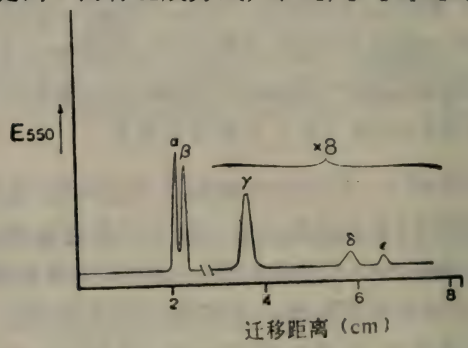


图 7.1 线粒体F_1-ATP酶的多肽(γ、δ和ε带放大 8 倍)

当 F_1 从膜上移下来之后，它的性质发生了改变。例如除了来源于耐热菌 PS3的极为稳定的TF_1 之外（见Kagawa等，1979），分离后的F_1 是冷不稳定的，会可逆地解离为各个亚基而失去催化活性。可溶性F_1 催化异常迅速的 ATP 水解作用。在25℃ 1mol F_1 每分钟能够催化水解 10^4mol ATP。相反，绝不会观察到水溶性F_1 催化反向反应，即 ATP 合成。水溶性 F_1 的核苷酸专一性并不是绝对的，ITP和GTP也能够被它水解。

F_1 能进一步解离而不失去催化活性。故用胰蛋白酶处理后得到的仅含 α 亚基与 β 亚基的复合体仍然保持某些催化活性。可能催化部位是连在 β 亚基上的，因为紫外光辐射下能形成共价结合的ATP的光亲和性结构类似物主要与β亚基相结合（Scheurich等，1978）。F_1 与 F_0 的结合看来需要小的 δ 亚基。合成酶具有一个被称为抑制蛋白的天然抑制物，它能防止在$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$低时ATP被水解。CF_1 线粒体酶受到更强的抑制。

大肠杆菌 ATP 合成酶各个亚基的功能是，通过测定在ATP合成中有缺陷的"unc"突变种来研究的（见 Downie等，1979；Gibson等，1979）。形成了大肠杆菌染色体上操纵子的一部分的 unc A 到 E这五个基因已被鉴别出来。并且证明了 uncA和 uncD基因是分别为F_1 的α亚基和β亚基编码的；uncB和uncC基因则可能是为F_0 的组分编码的。

完整的 F_1 并不能与 F_0 直接结合，除非存在另外的组分"寡霉素敏感性授与蛋白"或OSCP（分子量18kD）。寡霉素是一种由Streptomyces产生的抗菌素，通过结合于F_0 的一个组分（并非 OSCP 本身）而抑制ATP合成酶。寡霉素干扰经过F_0 的质子通道。在组装后的 F_1F_0 中，这足以阻止ATP的合成与水解，故寡霉素敏感性就成了F_1 向F_0 正确组装的一个判

断。因为在细菌和叶绿体(ATP 合成酶)中没有 OSCP，故寡霉素仅对线粒体ATP酶有效。双环己基碳化二亚胺(DCCD)具有不同的作用部位，但是对细菌和光合系统也有效。

正如大多数膜结合蛋白的情况一样，组成 F_0 的一组多肽难于纯化。这些多肽是高度疏水的，而完整的$F_1 \cdot F_0$复合体只有用破坏膜的方法才能被溶解。将该复合体溶解后，F_1和F_0能够被解离和分开。

来源于耐热菌PS3的 F_0 分子量为 92kd，含有三类亚基：6个拷贝的 54kd 的 DCCD-结合蛋白，3个拷贝的 13kD的 TF_1-结合蛋白，以及19kD的与线粒体中 OSCP 类似的碱性蛋白(Kagawa等，1979)。完整的$F_1 \cdot F_0$复合体可能是象图7.2所示那样装配的。

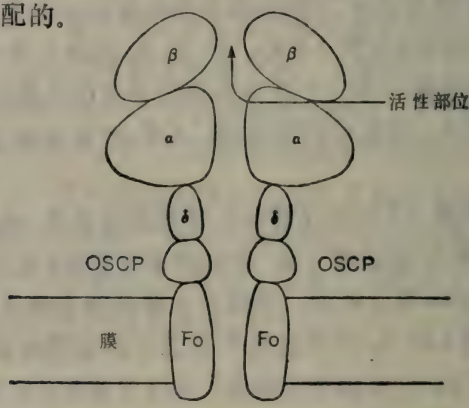


图7.2 $F_1 \cdot F_0$中多肽的可能装配

采用Racker (1976) 图示，这个图是假设的，由于不知道γ亚基和ε亚基的定位，故将它们省略了。

7.3 F_0 的 功 能

综述 Kagawa等，1979；Fillingame，1980

F_1 很容易从内翻外的亚线粒体颗粒上剥离下来。所得

到的没有F_1的颗粒不仅失去了合成或者水解ATP的能力，而且在所有依赖能量的过程中都无效了。加入寡霉素或是重新结合F_1能够恢复其能量转换性能。由于去掉F_1与加入质子移位体作用相同，这就提示F_0起着质子导体的作用，它传送质子通过膜交给F_1的催化部位。通常质子传导作用是要与ATP合成相偶联的，但是移走F_1就使得质子导体失去了控制，尽管还可以被寡霉素或DCCD抑制，但是不受ATP合成的支配(图7.3)。

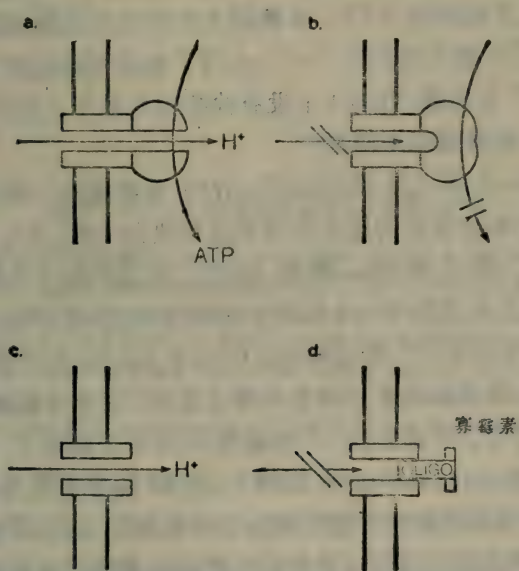


图 7.3 在完整的以及去掉F_1的细胞器中质子跨膜移位作用的条件

完整的ATP酶仅在ATP被合成时传导质子(a)。当净ATP合成停止时质子移位作用停止(b)。在去掉F_1的ATP合成酶中(c)存在着不受调节的质子移位作用，尽管它仍然可以被作用于F_0的试剂如寡霉素所抑制(d)。

当发现来源于中心线粒体的部分纯化的F_0(Kagawa等，

1973)或取自耐热菌的高度纯化的 TF_0(Okamoto 等, 1977)在重组膜系统中都显示质子传导作用时, 上述见解得到了进一步证实(图7.4)。

7.4 通过F_1的ATP合成的机制

尚不了解 ATP 合成酶是如何利用质子电化学电位朝着ATP合成的方向来改变 ATP 酶反应的平衡的。这一机制看来是与其他两种 ATP-水解质子泵即哺乳动物质膜 (Na^++K^+)ATP 酶和肌质网 Ca^{2+}—ATP 酶的作用机制不同, 因为在ATP 合成酶(反应)中没有检测到存在于上述两种酶反应体系中的磷酸化中间物。

Mitchell (见 Mitchell, 1976) 曾经提出一种质子涉及ADP在催化部位的脂化作用的直接机制(图7.5)。在这个模型中二个质子被$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$驱动, 通过F_0攻击Pi的一个氧原子, 形成一分子水并留下一个极其活泼的产物, 它可以与ADP 直接反应而形成ATP。在另外的由Boyer, Slater及其他人提出的机制中, 被移位的质子功能不那么直接, 而更为强调 F_1 中的多肽, 建议质子梯度的Gibbs能量是被用于诱导 F_1 的构象变化(Slater, 1974; Boyer, 1977)。这种构象变化再通过改变F_1对反应的底物和产物的相对亲和性而引起ATP 的合成。在活性部位的实际的 ATP合成作用将涉及较小的能量变化, 而最终由F_1释放所结合的 ATP 可能是主要需能步骤。在肌肉收缩期间, 肌球蛋白水解 ATP 时(图 7.6)对这种机制有一个先例, 此处结合的ATP涉及大的 Gibbs 能量变化, 并引起蛋白质构象的大变化, 而水解结合的 ATP 只引起很小的Gibbs能量变化(见Chappell, 1977)。

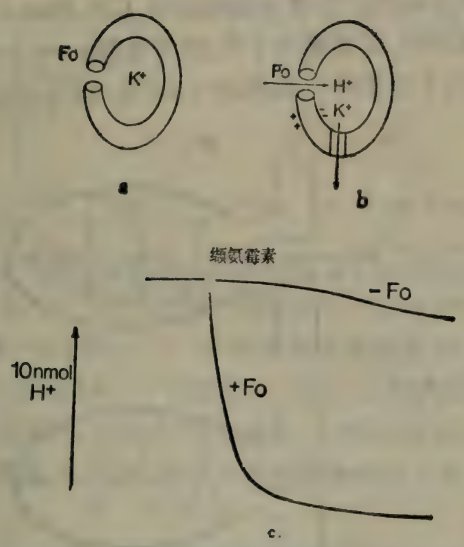


图7.4　纯化的F_0传递质子通过人工脂双分子层

来源于耐热菌PS3的高度纯化的F_0与大豆磷脂一起悬浮在含有Tricine缓冲的胆酸溶液中。通过16小时透析除去胆酸盐，使F_0嵌入双分子层的囊泡得以形成(第1.3节)。首先将囊泡于55°C在KCl介质中保温，以便KCl进入囊泡。然后再洗清它们并将它们悬浮在无K^+介质中与pH电极一起置于小槽中(a)。加入缬氨霉素，由于K^+流出其浓度梯度下降而产生扩散电位，响应这一电位的通过，F_0的H^+吸收作用被记录下来(b)。磷脂双分子层本身对质子是高度不通透的，因为在无F_0时没有H^+吸收作用发生(c)(数据来自Okanotu等，1977)。

有三方面的证据支持这一模型。首先$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$改变叶绿体CF_1的构象。Ryrie和Jagendorf(1972)的实验表明，^3H_2O中的^3H与CF_1中氢原子之间的缓慢交换可以被因光照而产生的$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$所加速，这反映了酶的四级结构的改变。在光照下，N-乙基马来酰亚胺与CF_1的γ-亚基的结合也显示增加(见McCarty，1979)。这种构象变化影响了CF_1的催化活性。如果不存在跨膜$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$叶绿体的酶是潜伏的(无活性的)，因而在存在质子移位体时不会水解ATP。随着$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$诱导的构

象变化，硫代试剂或胰蛋白酶的修饰，CF_1的催化活性不再为低$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$所抑制。根据结合于F_1的抑制剂aureovertin的荧光变化推断出了线粒体F_1的构象变化(见Slater，1974)。

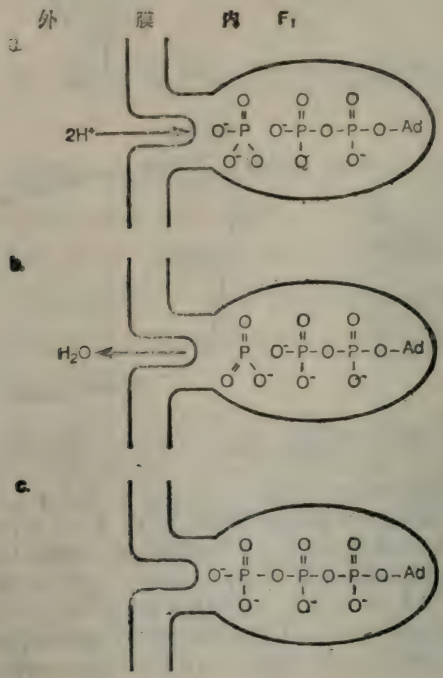


图 7.5 通过$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$合成ATP的直接模型

F_1和CF_1都具有腺苷酸的紧密结合部位。尽管在关于核苷酸结合部位是否位于ATP合成主要途径上或它们的作用是否调节方面有分歧(McCarty，1979)。

第三方面探讨是从同位素交换研究得来的。该技术的优点在于能够检测例如酶结合中间物之类的微量产物的形成。提供资料最多的是$H_2{}^{18}O$与Pi间的交换作用。据信，它阐述了在催化部位的ATP合成的动力学平衡无需将结合ATP

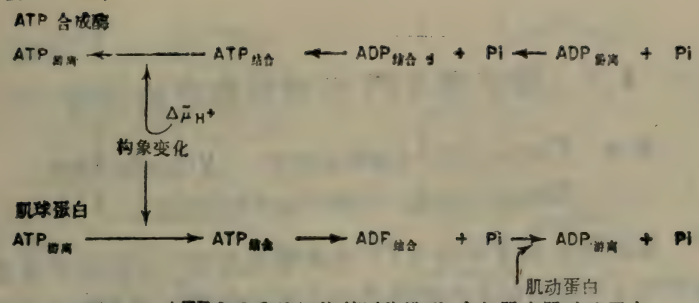


图 7.6 ATP合成酶的间接(机制)模型，有与肌肉肌动球蛋白复合体ATP水解机制共同的特征(根据Chappell, 1977)

释放到溶液中去(图 7.7)。此种交换被寡霉素抑制并需要ADP，但是在低$\Delta\bar{\mu}_{H+}$下仍能发生，这就表明主要的需能步骤不是ATP的合成，而是ATP的释放。关于交换反应的更为细致的分析，建议F_1含有两个交替起作用的催化部位(Boyer, 1977)。

F_1构象变化的本身并不能解释ATP合成与质子移位的偶联。就象呼吸链质子移位作用的构象模型一样(第5.4节)，ATP合成的构象模型必须使一系列步骤协调起来。最简单的模型如图7.8所示，模型中质子电化学电位本身所固有的能量由改变质子结合部位的结合亲和性来得到，当质子结合部位面向高电化学电位(C相)时，它具有低亲和性，当它面向低质子电化学电位(M相)时，具有高质子亲和性。

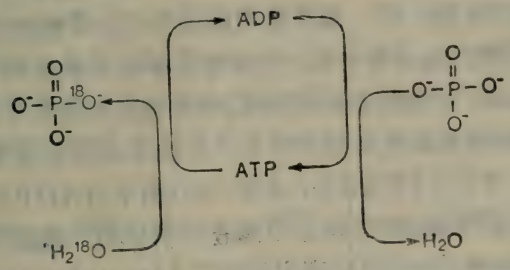


图7.7 ^{18}O由水掺到Pi顶示结合于ATP合成酶的ATP的可逆合成(reversible synthesis)。(注意连接β和γ磷酸基的氧是来自ADP，而不是Pi。)

7.5 腺苷酸与Pi在线粒体中的运输

综述 Fonyo, 1975（磷酸盐载体）；Vignais, 1976；Klingenberg, 1979a（腺苷酸移位体）

细菌和叶绿体中的ATP合成酶是在同一个区域中合成或利用ATP的，可是线粒体是在基质中合成ATP再把这些核苷酸输出到细胞液中。有两个载体参与这一过程：用来吸收Pi的磷酸盐载体和用于吸收ADP及输出ATP的腺苷酸移位体(见图7.12)。

磷酸盐载体催化$H_2PO_4^-$的电中性运输是通过与OH^-的交换，或是通过与质子的协同运输进行的，但这二者难以区分。该载体被P-苯酸汞和Mersalyl之类的汞试剂所抑制，也被N-乙基马来酰亚胺抑制，尽管这些抑制剂中没有一个是完全专一性的。磷酸载体活性极高。由于质子协同运输，故Pi的跨膜分布受pH的影响，因而简化了使得用氧脉冲注入法测定线粒体中的H^+/O比复杂化了的因素，利用它Pi能够跨膜重新分布，并部分地中和任何由呼吸作用所产生的ΔpH(第4.3节)。

腺苷酸移位体催化1：1的腺苷二磷酸和腺苷三磷酸通过内膜的交换(图7.9)。由于对细胞液中的核苷酸的吸收自动地被核苷酸的流出所补偿，所以基质中腺苷酸总库(ATP+ADP+AMP)的大小是不变的。即使将线粒体悬浮在无核苷酸的介质中(如在制备过程中)，一般也不会失去核苷酸。

移位体对ATP和ADP是专一的(而不对AMP专一)。它有几种特异性抑制剂。从地中海苍术属植物产酸苍术(*Atractylis gummifera*)中分离出的糖苷Atractyloside是一种腺苷酸结合与运输的竞争性抑制剂。密切相关的羧基苍术酸

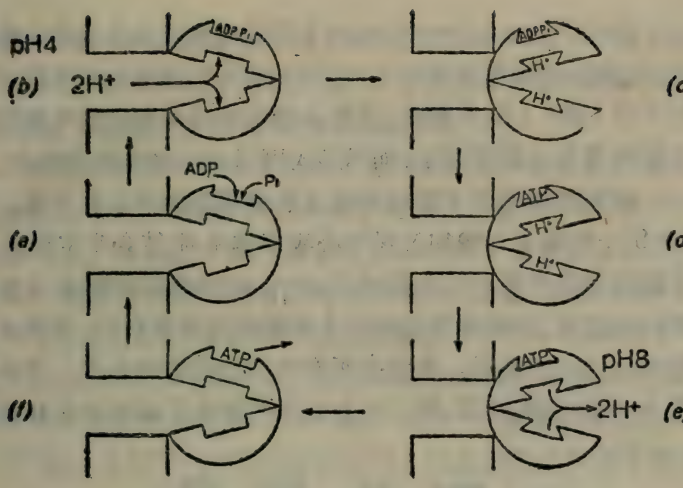


图 7.8 ATP 合成酶的可能模型

F_1 有两种构象，一种为非质子化的形式，其特征为低亲和力的质子结合部位朝向 F_0，并且有一个低亲和力的催化部位；而质子化的形式是高亲和力的质子结合部位(即具有增加了的 pK)背向 F_0，这种构象还引起催化部位亲和力的增加。(a) ADP 和 Pi 与低亲和力形式的催化部位相结合。(b) 来自 F_0 的质子与低亲和力质子结合部位相结合，作为催化部位亲和力极大增加的结果而引起构象上的变化(c)。用于这种变换的自由能来源于相应的质子结合亲和力的增加。(d) 通过一个仅涉及较小的自由能变化的步骤产生了一个紧密结合于催化部位的 ATP。(e)尽管这种构象状态的 pK 值很高，假如在右手一侧的质子的活性足够低的话，它们就能够从其结合部位解离下来。(f) 当质子解离时，构象即恢复到其初始状态，催化部位也回复成低亲和力的构象，从而使结合的 ATP 释放出来。

(carboxyatractylate) 结合得更为紧密 ($K_d = 10^{-8}$M) 且不能被腺苷酸所取代，由 *Pseudomonas cocvenenans* 产生的米酵霉酸，由于发现它是一个在污染后的可可食物产品米酵素样品中的毒素而得名，它是移位体的一种非竞争性抑制剂。

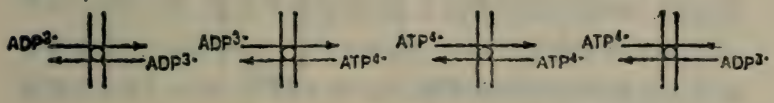


图 7.9 由腺苷酸移位体所催化的交换

在由 Klingenberg(1979a) 所提出的这种移位体的模型中，该载体以两种形式存在，它们的单核苷酸结合部位的方向性不同（图7.10）。C形式，其结合部位可以从细胞液中接近并可被羧基苍术酸所稳定，而M形式可以由米酵霉酸所固定。

有两种方法用于鉴定内膜上负责腺苷酸移位的多肽。当〔^{35}S〕-羧基苍术酸加入到牛心线粒体中时，结合非常稳定，能够经受使用非离子性去垢剂 Triton×100的膜溶解以及随后的纯化过程。该抑制剂使得这个多肽成为可鉴别的，并防止它在纯化过程中失活。事实上所有的同位素都结合于一个分子量为40kD的蛋白质。第二种方法是使用腺苷酸的光亲和性类

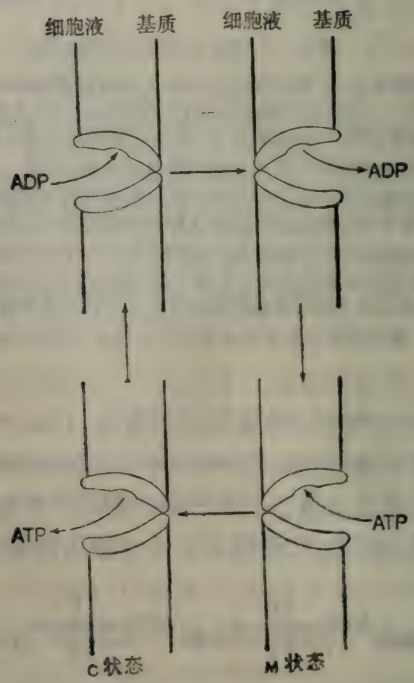


图 7.10 腺苷酸移位体的模型（根据 Klingenberg, 1979a）

似物，它是一个运输的竞争性抑制剂，在暗处可结合于载体的催化部位。在紫外光下它们失去N_2而形成高活性的硝基自由基，能够与最近的多肽即移位体共价结合。

被结合的蛋白质的表观分子量为30kD。从结合的标记物的量上来看，完整的移位体似乎是以分子量为60kD的双体起作用的。在心脏中移位体是线粒体内膜中含量最丰富的蛋白质。虽然当不存在膜电位时移位体对称地运输ADP和ATP，但在正常呼吸条件下是优先吸收ADP并释放ATP，与交换的生理方向相适应。这种不对称现象的原因是这两种核苷酸所带的相对电荷。ATP是以ATP^{4-}的形式被运输，而ADP是以ADP^{3-}的形式被运输的。所造成的电荷不平衡意味着每有60mV膜电位，交换的平衡就被影响10倍(图7.11)。

现在可以用ATP合成酶、腺苷酸移位体以及磷酸盐载体重新装配整个线粒体ATP的合成及输出体系(图7.12)。磷酸盐载体和腺苷酸移位体的综合效应是，每合成一个ATP即引起1个额外质子的流入。注意，尽管这个额外的质子看来是与Pi一起进入的，但这是一个电中性过程，该质子的电荷被用于驱动ADP^{3-}与ATP^{4-}的交换。

这个体系的热力学推论是值得考虑的。首先细胞液ATP/ADP+Pi库的三分之一的Gibbs能量不是来自于ATP合成酶本身，而是来源于随后的运输作用。其次，由于有三个质子被用于合成一个细胞液ATP，但是仅有两个质子被用于合成一个基质ATP，那么在状态4时，细胞质中ΔGp(第3.2节)可以高于基质中的ΔGp或者由内翻外的亚线粒体颗粒中产生的ΔGp的50%。这是可以看到的，分离出的线粒体的ΔGp能被保持高达64kJ mol^{-1}(Slater等，1973)，而亚线粒体的ΔGp则低于50kJ.mol^{-1}。对于提出的质子通过呼吸链排出的机制还推论对于每个ATP需要3个质子(第4.3节)。

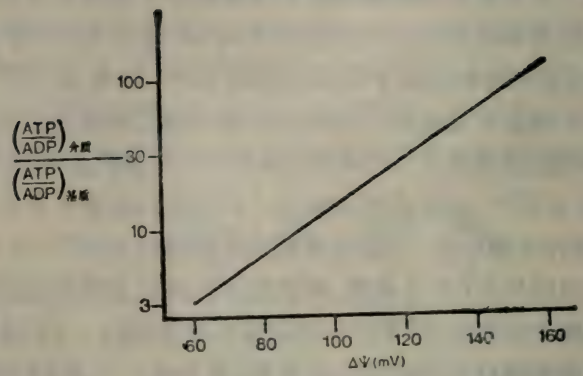


图 7.11 膜电位影响腺苷酸移位体的平衡

假如用ADP交换ATP时有1个静电荷不平衡，那就意味着(第3.5节)在平衡条件下，对于每60mV膜电位来说基质中ATP／ADP的比率将要比介质中低10倍，这是由Klingenberg与Rottenberg (1977) 测定的。线粒体在含缬氨霉素的介质中保温以便可以从^{86}Rb跨膜分布来测定△ψ(第4.2节)。保温液还含有〔^{14}C〕ATP和〔^{14}C〕ADP，含寡霉素(第7.2节)以抑制ATP合成，并含有琥珀酸作为呼吸底物。通过使介质中的K^+浓度在20m mol/L到50m mol/L间变化，△ψ将在60—170mV间变动。给足够的时间使腺苷酸在内膜两侧的分布达到平衡后，通过硅酮油离心(图4.5)把线粒体从培养介质中分离出来，并测定线粒体中及介质中的ATP和ADP含量。介质中与基质中ATP/ADP比率的不同随△ψ而增加，直至△ψ为160mV时，介质中ATP/ADP的比率要比基质中高125倍(数据来自Klingenberg与Rottenberg, 1977)。

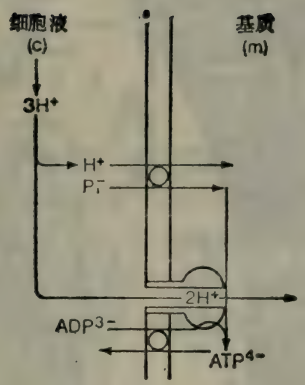
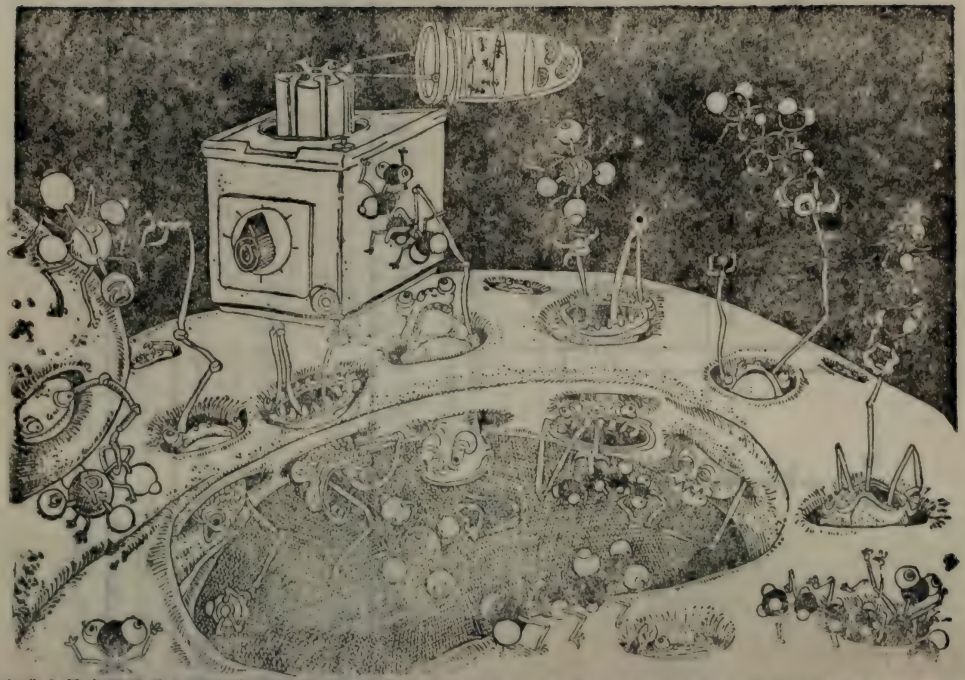


图 7.12 ADP 和 Pi 进入基质的移位作用以及 ATP 的输出涉及1个额外质子的移位

(为了简化，Pi/OH⁻的反向运输表示为与H⁺/Pi的同向运输相等。)

ATP合成酶	$ADP^{3-}_{(m)} + Pi^{-}_{(m)} + 2H^{+}_{(c)} \longrightarrow ATP^{4-}_{(m)} + 2H^{+}_{(m)}$
磷酸盐载体	$Pi\ (c) + H^{+}(c) \longrightarrow Pi\ (m) + H^{+}(m)$
腺苷酸移位体	$ADP^{3-}_{(c)} + ATP^{4-}_{(m)} \longrightarrow ADP^{3-}_{(m)} + ATP^{4-}_{(c)}$
总　　计	$ADP^{3-}_{(c)} + Pi^{-}_{(c)} + 3H^{+}_{(c)} \longrightarrow ATP^{4-}_{(c)} + 3H^{+}_{(m)}$

注：(m)，在基质中；(c)，在细胞液中。



线粒体内膜上具有磷酸盐与羟基交换、磷酸盐与苹果酸盐交换以及苹果酸盐与柠檬酸盐($+H^+$)交换的几种载体

8 生物能细胞器与其环境间的相互作用

8.1 引 言

生物能细胞器只有在与细胞液(就线粒体和叶绿体来说)或是与外环境(就细菌来说)存在持续的代谢物质及终产物的交换时才具有功能。此外,这些细胞器在保持用于ATP合成的高$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$时,还必须调节它们的离子成分。为了同时行使这些功能,它们逐渐形成了一套精巧细致的离子及代谢物载体系统,对此本章予以讨论。

8.2 代谢物运输的研究方法

综述 Palmieri与Klingenberg, 1979; LaNoue与Schoolwerth, 1979

本节主要涉及研究线粒体中代谢运输的方法,尽管这些方法也同样可以应用于其他体系。高速率的运输与小的内部体积的结合提出了一个实验上的重要问题。虽然大多数通过细胞质膜的运输过程的$t_{1/2}$值为数小时,可是通过线粒体内膜的运输——无论是净流动或是交换,却是在几秒钟内完成的瞬间过程。

测定代谢物运输的快速定性分析技术依据大量溶质进入所引起基质的渗透膨胀(第2.7节)。假如把非呼吸线粒体悬浮于待测阴离子的等渗盐溶液中,并有阳离子和阴离子(的通透)途径,而且保持了电荷平衡与pH平衡的话,那么线粒体就

会膨胀，光散射降低（第2.7节）。代谢物的进入经常最终与质子协同运输相联系，在这种情况下，使用铵盐可以防止基质的酸化，NH_3是可以透过膜的（第2.4节）并在基质中质子化形成NH_4^+。

Chappell(1968)发展了“铵膨胀”(ammonium swel-

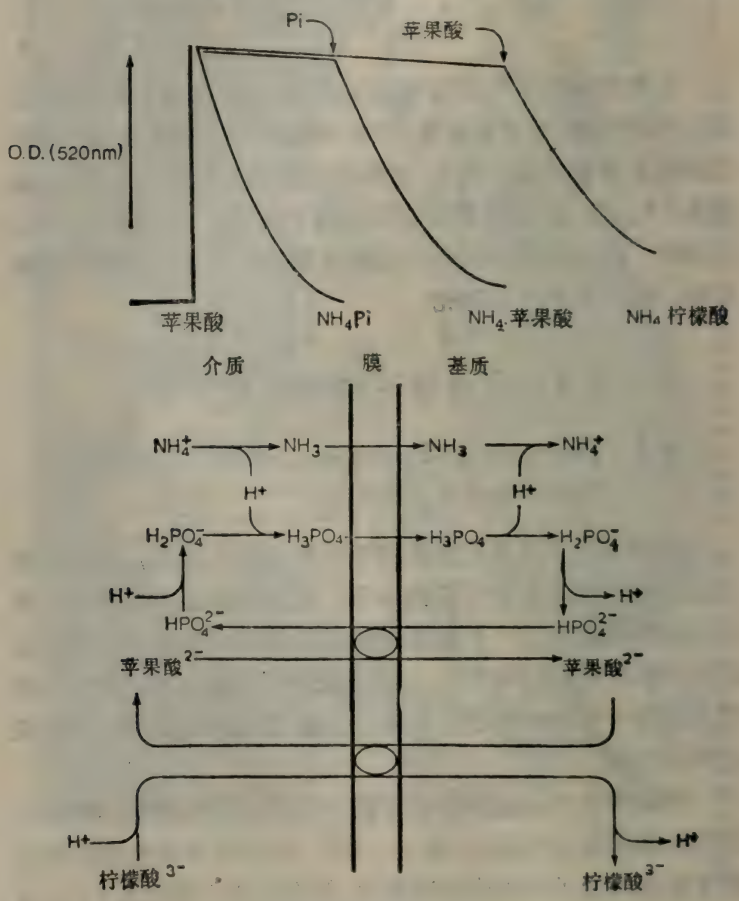


图 8.1 铵膨胀与线粒体的代谢物载体

ling)技术以检测电中性运输体系。由于线粒体在磷酸铵溶液中迅速地膨胀，磷酸盐运输(第7.6节)被证明等同于图8.1中的$H^+/H_2PO^-_4$协同运输。相反，在苹果酸铵中只有当Pi浓度低时才发生膨胀，这表明了磷酸盐载体与苹果酸盐/磷酸盐交换间的关系。在柠檬酸铵中的膨胀则需要Pi和苹果酸二者都存在，说明这种情况是一个三级串联过程。

这种膨胀技术难于定量并需要高等渗浓度的阴离子。追踪通过交换或净运输进入线粒体基质的放射性标记的代谢物是一种更为直接的方法，它避免了这些问题。假如要解决动力学问题，基质代谢物库与培养液间迅速的平衡需要应用快速技术。硅酮油离心(图4.5)是最常用的方法，而且通过加入特异性运输抑制物在离心之前终止运输作用会使时间分辨率(time-resolution)得以改善。利用这种抑制剂终止法(inhibitor-stop method)，时间分辨率会提高到1秒以下。已经研制了自动化的装置，它可以从单一培养物中取出序列样品，故能测定动力学。

大多数线粒体中的运输体系催化交换反应，所以必须在线粒体中充以相宜的交换对象，以便获得可靠的结果。

8.3 线粒体的代谢物载体

综述 Meijer与van Dam，1974；LaNoue与Schoolwerth，1979

表8.1列举了目前在线粒体内膜中鉴定的主要代谢物载体；这个目录可能不够详尽。腺苷酸移位体与磷酸盐载体在ATP合成部分(第7.6节)已经谈过了。由于氧化磷酸化是线粒体最基本的功能，故这两种载体是普遍存在的。同样，由于丙酮酸和脂肪酸是线粒在体内的主要底物，所以丙酮酸载体和

肉毒碱载体也是广泛分布的。

对丙酮酸载体的确切鉴定是较近的事。因为丙酮酸是单羧基酸，根据乙酸的先例(第2.4节)，人们争辩说丙酮酸也无需载体即可通过双分子层区。然而饱和动力学和特异性抑制剂氰羟基肉桂酸盐的论证都进一步确定有载体包括在运输中。如同其他载体的情况一样，必须注意到丙酮酸$^-$/OH^-的反向运输与丙酮酸$^-$/H^+的协同运输是无法区分的。

肉毒碱载体也是近来被鉴定的。起初认为酰基肉毒碱进入基质是基团移位作用(第1.4节)的一个实例，即只是酰基基团而不是肉毒碱真正通过了膜。肉毒碱载体将肉毒碱与短链的或长链的酰基肉毒碱相交换。

还有两种载体也出现在许多不同的线粒体中，它们是2-氧(代)戊二酸(即α-酮戊二酸)载体和谷氨酸盐-天冬氨酸盐载体(表8.1)。它们都被包括在苹果酸-天冬氨酸盐运输过程中(图8.2)，该设计允许细胞液中的NADH被呼吸链氧化，而没有顾及内膜是对核苷酸不通透的这个事实。由这一过程所造成的另一个问题是，细胞液中NAD^+/NADH电偶的E_h比基质中同样电偶的Eh高得多(即还原性低)。这种热力学的僵局被谷氨酸盐-天冬氨酸盐载体的电学不平衡所克服了，它用谷氨酸盐$^{2-}$和一个质子交换天冬氨酸盐$^{2-}$，从而能够当存在跨膜$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$时沿着吸收谷氨酸盐放出天冬氨酸盐的方向驱动反应。

α-甘油磷酸盐循环过程为细胞液中NADH的氧化作用提供了另一个途径(图8.3)。它利用两个在大多数细胞中都存在的α-甘油磷酸脱氢酶——一个在细胞液中的酶与NAD^+相偶联，另一个酶在线粒体内膜的外侧将电子直接供给UQ。在这种情况下，由于将电子在接近0 mV的电位下供给了泛醌库而导致了方向性(图5.11)。

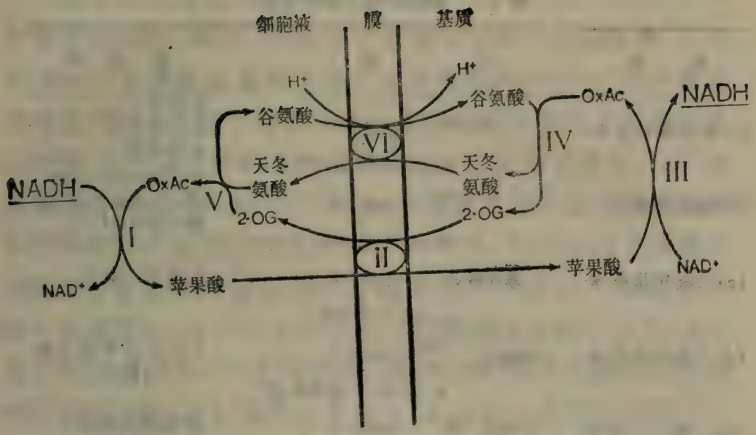


图 8.2 细胞液中NADH氧化作用的谷氨酸盐-天冬氨酸盐循环

(I)细胞液中的NADH为细胞液的苹果酸脱氢酶氧化；(II)苹果酸盐与2-酮戊二酸盐交换而进入基质；(III)苹果酸被基质中的苹果酸脱氢酶再氧化成草酰乙酸，产生基质NADH；(IV)基质草酰乙酸盐与谷氨酸盐发生氨基转移作用形成天冬氨酸盐和2-酮戊二酸盐，它们被交换离开基质；(V)2-酮戊二酸盐在细胞液中与运输出的天冬氨酸盐转移氨基而再生成细胞液的草酰乙酸和将要重新进入基质的谷氨酸盐；(VI)通过质子同向运输以交换天冬氨酸盐。

二羧酸盐和三羧酸盐载体在肝线粒中的活性很高，但是在心脏线粒体中却几乎不存在。这两种载体都允许三羧酸循环的中间物从基质中被净运走(net export)分别用于糖原异生作用和脂肪酸合成，这两种载体都是电中性的，三羧酸盐载体是靠柠檬酸盐与一个质子的共同运输来实现这点的。

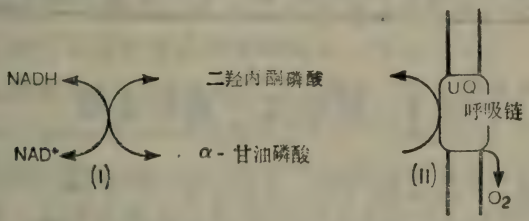


图 8.3 氧化细胞液NADH的α-甘油磷酸盐循环

(I)细胞液中与NAD+偶联的脱氢酶；(II)线粒体的酶

表 8.1 线粒体的代谢物载体

载　体	功　能	抑 制 剂
(a)腺苷酸移位体	$ADP^{3-} \rightleftarrows ATP^{4-}$	苍术苷 羰基苍术苷 米酵霉酸
(b)磷酸盐载体	$Pi^{-} \rightleftarrows OH^{-}$	SulPhydryl 试剂 (N-乙基马来酰亚胺)(mersalyl)
(c)二羧酸盐载体	苹果酸盐$^{2-} \rightleftarrows Pi^{2-}$	丁基丙二酸盐
(d)三羧酸盐载体	柠檬酸盐$^{3-}+H^{+} \rightleftarrows$ 苹果酸盐$^{2-}$	1,2,3-苯甲基三羧酸盐
(e)α-酮戊二酸盐载体	α-酮戊二酰$^{2-} \rightleftarrows$ 苹果酸盐$^{2-}$	苯基琥珀酸盐
(f)谷氨酸盐-天冬氨酸盐载体	谷氨酰$^{2-}+H^{+} \rightleftarrows$ 天冬氨酰$^{2-}$	—
(g)谷氨酸盐载体	谷氨酰$^{-} \rightleftarrows OH^{-}$	
(h)丙酮酸盐载体	丙酮酰$^{-} \rightleftarrows OH^{-}$	氰羟基肉桂酸盐
(i)肉毒碱载体	酰基肉毒碱$^{+} \rightleftarrows$ 肉毒碱$^{+}$	
(j)鸟氨酸载体	鸟氨酸 $\rightleftarrows H^{+}$	

8.4 线粒体中的钙运输

综述　Bygrave, 1977; Carafoli与Crompton, 1977; Nicholls 与 Crompton, 1980; Saris 与 Åkerman, 1980

化学渗透理论为线粒体积累 Ca^{2+} 的非凡能力提供了一个简单的观察，因为二价阳离子跨膜带电单一运输维持了约为180mV的膜电位，故可以预言它将导致不少于10^6的平衡浓度梯度(图3.5)。然而这种非常巨大的积累又提出了细胞方面的问题，由于基质中存在的pi大概会阻止基质中游离 Ca^{2+}浓度增加很多，超过1mmol/L以上，这就意味着平衡态的细胞液中的游离Ca^{2+}浓度必须低至 10^{-9}mol/L。相反的是大多数对细胞液中游离Ca^{2+}浓度的估计值是在 10^{-7}到 10^{-6}mol/L 这样一个范围内，这不仅是由于单一运输载体太强有力了，而且由于它仅能使 Ca^{2+} 在细胞液与基质间的分布为膜电位的改变所调节(式3.29)，这将会干扰ATP 合成与代谢物的分布。

随着在肝脏线粒体(Puskin等，1976)与心脏线粒体(Crompton与Carafoli 1976)中发现了独立工作的外流途径(efflux parthway)后，这一难题得到了解决。就心脏、脑或褐色脂肪中的线粒体来说，这一外流途径以 Ca^{2+} 交换 Na^+，而就肝线粒体来说，Ca^{2+} 则最终被用来交换质子(图8.4)。由于通过外流途径得到的平衡分布与通过单一运输 (图 3.4)得到的大不相同，有一个缓慢而持续的Ca^{2+}循环靠轻弱地消耗$\Delta\bar{\mu}_{H^+}$而跨膜存在 (图 8.4)。这种双途径体系有着多种优点。不仅分布的稳态远远小于10^6，而且能够通过改变两个途径中任何一个的动力学参数而不改变 $\Delta\psi$ 和 ATP 合成来调节分布，最后，如同任何循环体系一样，调节作用会十分敏感：任何一个途径的细微变化都能导致净流动的高百分比变化。

研究线粒体中Ca^{2+}运输的方法极多。除了用原子吸收作用(atomic absorption)直接测定Ca^{2+}以外，借助$^{45}Ca^{2+}$可以进行同位素测定，可以使用Ca^{2+}-选择性电极或者利用arsenazo Ⅲ 一类的金属发色指示剂 (metallochromicindicator)，它们在与 Ca^{2+}结合时光谱发生变化(Scarpa，1979)。

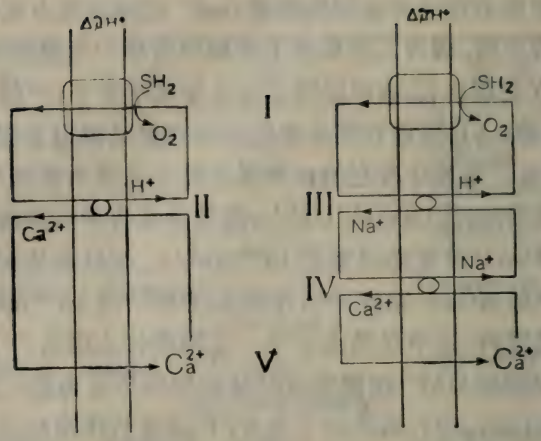


图 8.4 在肝脏线粒体(左)与心脏线粒体(右)中的稳态Ca^{2+}循环

(I) 呼吸链; (II) 肝线粒体中的 Ca^{2+}/H^{2+}交换; (III) 心脏线粒体中的 Na^{+}/H^{+}交换;(IV)心脏线粒体中的Ca^{2+}/Na^{+}交换; (V)Ca^{2+}单一运输。没有详细说明它们的化学计量关系。

独立的外流途径的存在可以在一旦获得稳态条件后很简单地通过吸收途径的选择性抑制来证实。糖蛋白染色剂钌红(ruthenium red)是这类抑制剂的一种，它在很低的浓度即可抑制单一运输体。虽然对于通过反转单一运输体而引起的流出量来说 $\Delta\psi$ 太高了，但因为外流途径未受影响，所以可以看到Ca^{2+}从基质中的净流出(图 8.5)，单一运输体也会被其他多价阳离子如Mg^{2+}和镧化物(它在高浓度时也影响外流途径)所抑制。

Ca^{2+}、H^{+}和(就心脏来说)Na^{+}的跨膜稳态循环并不涉及离子跨膜的净运动(图8.4)。然而，当存在净Ca^{2+}积累时，阳离子的进入必须得到补偿。在完全不存在电中性可渗透弱酸的情况下，Ca^{2+}的吸收在电荷上是通过呼吸链排出质子而得到平衡的，其化学计量关系为$2H^{+}/Ca^{2+}$。这导致跨膜ΔpH的

迅速增加，结果$\Delta\psi$下降（$\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$基本不变，图4.8）。在这种条件下（即存在NEM以抑制内源性Pi的运动，第7.6节）Ca^{2+}的积累非常有限并能迅速地建立一2单位的ΔpH。

假如存在电中性可渗透弱酸的话，弱酸能够响应这一ΔpH而进入基质中，从而耗散pH梯度并允许$\Delta\psi$增加，这又引起进一步的Ca^{2+}吸收。醋酸就是这样的一种阴离子，而Pi不仅耗散ΔpH，还能在基质中形成$Ca_3(PO_4)_2$复合体，使得十分大量的Ca^{2+}被贮存起来。由于尚不清楚的原因，线粒体有时对存在Pi的Ca^{2+}积累反应不良，表现为膨胀，膜电位崩溃以及Ca^{2+}释放。这种"损伤"会由于PEP，苍术酸（atractylate），或由于基质中NAD(P)H的氧化作用（例如被AcAc）所强化，将线粒体置于含有低浓度的ATP或ADP的

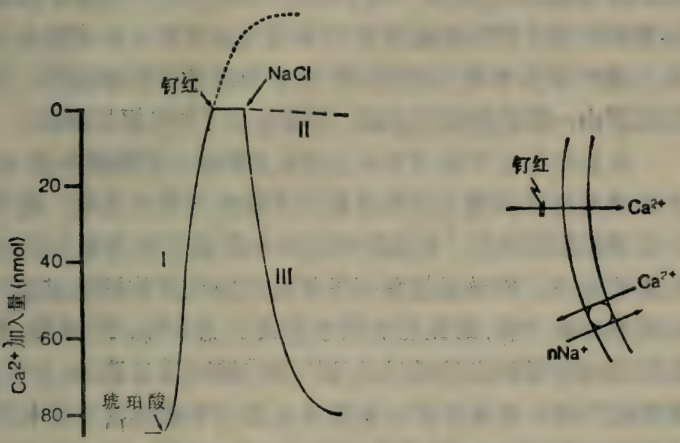


图 8.5 依赖于Na^+的心脏线粒体中的Ca^{2+}外流

心脏线粒体在KCl介质中在70n mol Ca^{2+}mg蛋白$^{-1}$下保温。在标记处加入琥珀酸作为底物，Ca^{2+}单一运输体导致一个Ca^{2+}的净积累(I)；由于缺少Na^+，外流途径无活性。随后加入单一运输的抑制剂钌红，Ca^{2+}的净运输实际上停止(II)。当单一运输仍然被抑制时，加入13m mol NaCl激活了外流途径，发生了被积累的Ca^{2+}的完全外流(III)（数据来源于Crompton等，1976）。

介质中可以防止损伤。必须谨慎地将这种损伤性的外流与上面讨论过的独立外流途径区别开，后者的存在并不引起 $\Delta\psi$ 崩溃。

8.5 细菌中的运输

综述 Hamilton, 1975, 1977; Harold, 1977; Wilson, 1978

细菌被迫在线粒体或叶绿体从未经历过的极为多变且通常是较敌对的环境中求生存。其结果它们发展了多种吸收氨基酸和糖等代谢物的机制。由于化学渗透假说的起因是Mitchell想解释细菌中"主动运输"的愿望，所以细菌运输机制之一的磷酸转移酶系统（phosphotransferase system）代表了最彻底证实了的定向基团移位作用的例子就十分有意义了。第二类运输机制是"化学渗透"的且与质子循环相联系；第三类机制由一套代谢物泵组成，直接与 ATP 水解相联系。

所提出的化学渗透机制如图8.6所示。其最简单的假设是如赖氨酸等阳离子化的代谢物带着它们的正电荷一起被单一运输机制所输送，在这种情况下它们的平衡分布会成为膜电位的函数。象异亮氨酸等不带电荷的代谢物则通过质子协同运输而透过膜，因此它的积累就成了总 $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ 的函数，而带负电荷的代谢物也是通过质子协同运输而透过膜的，会与pH梯度相平衡。并不存在一个为什么必须把其他的质子化学计算法排除在外的理由（见 Rottenberg, 1976）。

在文献中记载的最好的化学渗透机制是典型的大肠杆菌乳糖透性酶（lactose permease，图1.13），它运输乳糖和其他种 β-半乳糖苷（West与Mitchell, 1972, 1973）。这种不带电的乳糖及其非代谢性类似物硫代甲基半乳糖苷的运输都是

与一个质子的协同运输相偶联的。

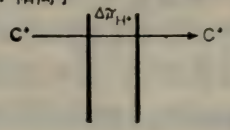
依赖于ATP的代谢物运输已在多种革兰氏阴性细菌中得到了证明。在周质空间的运输是与分子量为20—40的特异的结合蛋白的存在相关的。这类蛋白质对代谢物有专一性，与之呈高亲和性的结合。有二十种以上的蛋白质被人们描述过。渗压震扰(osmotic shock)会导致这类蛋白的流失以及依赖于ATP的运输的减弱。这类蛋白质并不能代表载体本身，但是它赋予运输过程以亲和性和特异性。尚不清楚是否有共同的运输体存在，还是每种代谢物有它们各自的运输体。

对渗压震扰的敏感性可作为区分化学渗透机制与依赖于ATP机制的一个标准。此外，化学渗透机制对质子移位体敏感，其在缺乏ATP合成酶的突变种中需要氧化态的底物，同时它对砷酸盐(它耗尽ATP)有抗性。相反，"可震扰"的运输对质子移位体具有抗性，在ATP合成酶缺乏的突变种中它是依赖于糖酵解而不依赖于呼吸的，这种运输可以被砷酸盐抑制。依赖于ATP的运输也存在于革兰氏阳性细菌中，但在这种情况里没有周质结合的蛋白质。

第三种运输机制即磷酸转移酶系统，在如大肠杆菌和金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)之类的细菌中催化包括葡萄糖等一些糖类的运输，该系统的独特性质是将所运输的糖在代谢前先磷酸化，与运输过程结合而产生基团移位作用(图8.7)。这种机制只限于厌氧的及兼性细菌中，而不存在于好氧的细菌中。在金黄色葡萄球菌中所有的糖类都被这种系统输送，但是在大肠杆菌中则只有葡萄糖等几种是通过这种系统摄入的。磷酸烯醇丙酮酸起一个磷酰基供体的作用，它使酶Ⅰ磷酸化，磷酸化的酶Ⅰ又将一小的热稳定性蛋白HP_r磷酸化。这两种蛋白质都是可溶性的，基本的而且不显示糖特异性。在金黄色葡萄球菌中，磷酸基团被转移到一个

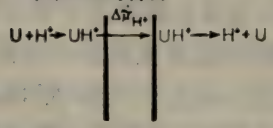
可溶性、具有糖特异性的因子Ⅲ上。因子Ⅲ由三个分子量为12kD的亚基组成，每个亚基均可结合一个磷酸。最后磷酸化的因子Ⅲ、糖及一个结合于膜上具有糖特异性的酶Ⅱ形成一个三元复合体。随后在糖被运输的时候，磷酸就由因子Ⅲ转移到糖上了。

a．阳离子



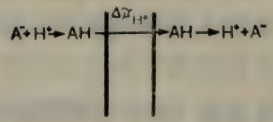
$$\Delta\tilde{\mu}_{C^+}=\Delta\Psi-60\log_{10}\frac{[C^+]in}{[C^+]out}$$

b．不带电荷的物质



$$\Delta\tilde{\mu}_U=\Delta\tilde{\mu}_{H^+}-60\log_{10}\frac{[U]in}{[U]out}$$

c．阴离子



$$\Delta\tilde{\mu}_A-=-60\Delta pH-60\log_{10}\frac{[A^-]\ in}{[A\ ]\ out}$$

图 8.6 细菌代谢物积累的化学渗透图解

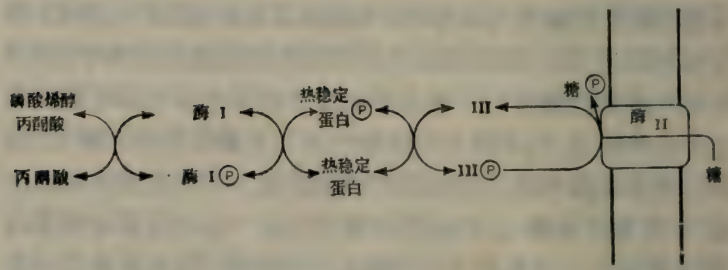


图 8.7 糖运输的磷酸转移酶系统

参 考 文 献

Åkerman, K. E. O. & Wikström, M. K. F. (1976). *FEBS Lett.* **68**, 191–197.

Avron, M. (1977). *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 143–155.

Avron, M. (1978). *FEBS Lett.* **96**, 225–232.

Banks, B. E. C. & Vernon, C. A. (1978). *Trends Biochem. Sci.* **3**, N156–N158.

Bashford, C. L. & Smith, J. C. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 569–586.

Beinert, H. (1978). *Methods Enzymol.* **54**, 133–150.

Bennett, J. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, 268–271.

Blankenship, R. E. & Parson, W. W. (1978). *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 635–653.

Blok, M. C., Hellingwerf, K. J. & Van Dam, K. (1977). *FEBS Lett.* **76**, 45–50.

Boyer, P. D. (1965) *In* "Oxidases and Related Redox Systems" (T. E. King, H. S. Mason & M. Morrison, ed.) pp. 994–1008. New York, Wiley.

Boyer, P. D. (1977). *Trends Biochem. Sci.* **2**, 38–41.

Boyer, P. D., Chance, B., Ernster, L., Mitchell, P., Racker, E. & Slater, E. C. (1977). *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 955–1026.

Brand, M. D. (1977). *Biochem. Soc. Trans.* **5**, 1615–1620.

Brand, M. D., Reynafarje, B. & Lehninger, A. L. (1976). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **73**, 437–441.

Brand, M. D., Harper, W. G., Nicholls, D. G. & Ingledew, W. J. (1978). *FEBS Lett.* **95**, 125–129.

Bygrave, F. L. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.* **6**, 259–318.

Carafoli, E. & Crompton, M. (1977). *Curr. Topics Membr. Trans.* **10**, 151–216.

Chance, B. & Williams, G. R. (1955). *J. Biol. Chem.* **217**, 409–427.

Chappell, J. B. (1968). *Brit. Med. Bull.* **24**, 150–157.

Chappell, J. B. (1977). "ATP", Carolina Biology Reader **50**. Carolina Biological Supply Co., Burlington, N. Carolina, USA.

Chappell, J. B. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, N3–N4.

Chappell, J. B. & Crofts, A. R. (1966). *In* "Regulation of Metabolic Processes in Mitochondria" (J. M. Tager, S. Papa, E. Quagliariello & E. C. Slater, ed.) pp. 293–314. Elsevier, Amsterdam.

Chappell, J. B. & Haarhoff, K. N. (1967). *In* "Biochemistry of Mitochondria" (E. C. Slater, Z. Kaniuga & L. Wojtchak, ed.) pp. 75–91. Academic Press, London & New York.

Clayton, R. K. & Sistrom, W. R. (1979). "The Photosynthetic Bacteria". Plenum New York.

Crofts, A. R. & Wood, P. M. (1977). *Curr. Topics Bioenergetics* **7**, 175–244.

Crompton, M. & Carafoli, E. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 338–352.

Crompton, M., Capano, M. & Carafoli, E. (1976). *Eur. J. Biochem.* **69**, 453–462.

Dawson, A. G. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, 171–176.

DePierre, J. W. & Ernster, L. (1977). *Annu. Rev. Biochem.* **46**, 201–262.
Downie, J. A., Gibson, F. & Cox, G. B. (1979). *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 103–132.
Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Y. & Skulachev, V. P. (1974). *Nature (London)* **249**, 321–324.
Dutton, P. L. (1978). *Methods Enzymol.* **54**, 411–435.
Dutton, P. L. & Prince, R. C. (1978) *In* "The Photosynthetic Bacteria" (R. K. Clayton & W. R. Sistrom, ed.) pp. 525–570, Plenum, New York.
Dutton, P. L. & Wilson, D. F. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 165–212.
Eisenbach, M. & Caplan, S. R. (1977). *Trends Biochem. Sci.* **2**, 245–247.
Eisenbach, M. & Caplan, S. R. (1979). *Curr. Topics Membr. Trans.* **12**, 165–248.
Erecinska, M., Veech, R. L. & Wilson, D. F. (1974). *Arch. Biochem. Biophys.* **160**, 412–421.
Ernster, L. & Lee, C. P. (1964). *Annu. Rev. Biochem.* **33**, 729–788.
Ferguson, S. J., Jones, O. T. G., Kell, D. B. & Sorgato, M. C. (1979). *Biochem. J.* **180**, 75–85.
Fillingame, R. H. (1980). *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 1079–1113.
Fonyo, A., Ligeti, E., Palmieri, F. & Quagliariello, E. (1975). *In* "Biomembranes, Structure and Function" (G. Gardos & I. Szasz. ed.) pp. 287–306. North-Holland, Elsevier.
Garland, P. B. (1978). *Nature (London)* **276**, 8–9.
Gibson, F., Cox, G. B. & Downie, J. A. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, 260–263.
Gingras, G. (1978). *In* "The Photosynthetic Bacteria" (R. K. Clayton & W. R. Sistrom, ed.) pp. 119–131. Plenum, New York.
Gomez-Poyou, A. & Gomez-Lojero, C. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.* **6**, 221–257.
Greville, G. D. (1969). *Curr. Topics Bioenerg.* **3**, 1–78.
Gromet-Elhanan, Z. (1977). *Trends Biochem. Sci.* **2**, 275–277.
Haddock, B. A. (1980). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* **290**, 329–339.
Haddock, B. A. & Jones, C. W. (1977). *Bact. Rev.* **41**, 47–99.
Hamilton, W. A. (1975). *Advan. Microbiol. Physiol.* **12**, 1–53.
Hamilton, W. A. (1977). *In* "Microbial Energetics" (B. A. Haddock & W. A. Hamilton, ed.) pp. 185–216. Cambridge University Press, Cambridge.
Harmon, H. J., Hall, J. D. & Crane, F. L. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **344**, 119–155.
Harold, F. M. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.* **6**, 84–149.
Hatefi, Y. (1978). *Methods Enzymol.* **53**, 3–5 *et seq.*
Hatefi, Y., Haavik, A. G., Fowler, L. R. & Griffiths, D. E. (1962). *J. Biol. Chem.* **237**, 2661—2669.
Hauska, G. & Trebst, A. (1977). *Curr. Topics Bioenerg.* **6**, 151–220.
Henderson, P. J. F. (1971). *Annu. Rev. Microbiol.* **25**, 393–428.
Henderson, R. & Unwin, P. N. T. (1975). *Nature (London)* **257**, 28–32.
Hill, R. (1965). *Essays Biochem.* **1**, 121–151.
Hinkle, P. C. & Mitchell, P. (1970). *Bioenergetics* **1**, 45–60.
Höjeberg, B. & Rydström, J. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 275–283.
Ingledew, W. J., Cox, J. C. & Halling, P. J. (1977). *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 193–197.
Jagendorf, A. T. (1975). *In* "Bioenergetics of Photosynthesis" (Govindjee, ed.) pp. 413–492. Academic Press, New York & London.
Jagendorf, A. T. & Uribe, E. (1966). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **55**, 170–177.
John, P. & Whatley, F. R. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 129–153.
Jones, C. W. (1977). *In* "Microbial Energetics" (B. A. Haddock & W. A. Hamilton, ed.) pp. 23–59. Cambridge University Press, Cambridge.

Jones, O. T. G. (1977). *In* "Microbial Energetics" (B. A. Haddock & W. A. Hamilton, ed.) pp. 151–183. Cambridge University Press, Cambridge.
Junge, W. (1977). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **28**, 503–536.
Junge, W. & Witt, H. T. (1968). *Z. Naturforsch. Teil B* 23, 244–254.
Kaback, H. R. (1974). *Science* **186**, 882–892.
Kagawa, Y. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **265**, 297–338.
Kagawa, Y. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 45–93.
Kagawa, Y., Kandrach, A. & Racker, E. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 676–684.
Kagawa, Y., Sone, N., Hirata, H. & Yoshida, M. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, 31–33.
Kell, D. B. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 54–99.
Klingenberg, M. (1979a). *Trends Biochem. Sci.* **4**, 249–252.
Klingenberg, M. (1979b). *Methods Enzymol.* **56**, 229–232.
Klingenberg, M. & Rottenberg, H. (1977). *Eur. J. Biochem.* **73**, 125–130.
Konings, W. N. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 378–388.
Kozlov, I. A. & Skulachev, V. P. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 29–89.
Kröger, A. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 129–145.
Kröger, A. & Klingenberg, M. (1973). *Eur. J. Biochem.* **34**, 358–365.
LaNoue, K. F. & Schoolworth, A. C. (1979). *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 871–922.
Lee, C.-P. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 105–114.
Lundegårdh, H. (1945). *Arch. Bot.* **32A**, 12, 1.
Meijer, A. J. & van Dam, K. (1974). *Biochim. Biophys. Acta* **346**, 213–244.
McCarty, R. E. (1979). *Trends Biochem. Sci.* 4, 28–30.
Mitchell, P. (1961). *Nature (London)* **191**, 423–427.
Mitchell, P. (1962). *Biochem. Soc. Symp.* **22**, 142–168.
Mitchell, P. (1966). "Chemiosmotic Coupling in Oxidative and Photosynthetic Phosphorylation". Glynn Research, Bodmin, Cornwall, U.K.
Mitchell, P. (1968). "Chemiosmotic Coupling and Energy Transduction". Glynn Research, Bodmin, Cornwall, U.K.
Mitchell, P. (1974a). *FEBS Lett.* **33**, 267–274.
Mitchell, P. (1974b). *FEBS Lett.* **43**, 189–194.
Mitchell, P. (1975a). *FEBS Lett.* **56**, 1–6.
Mitchell, P. (1975b). *FEBS Lett.* **59**, 137–139.
Mitchell, P. (1976a). *J. Theoret. Biol.* **62**, 327–367.
Mitchell, P. (1976b). *Biochem. Soc. Trans.* **4**, 399–430.
Mitchell, P. (1977). *FEBS Lett.* **78**, 1–20.
Mitchell, P. (1979a). *Eur. J. Biochem.* **95**, 1–20.
Mitchell, P. (1979b). *Science* **206**, 1148–1159.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1958). *Proc. Roy. Soc., Edinburgh* 27, 61–72.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1965). *Nature (London)* **208**, 147–151.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1967a). *Biochem. J.* **105**, 1147–1162.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1967b). *Biochem. J.* **104**, 588–600.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1968). *Eur. J. Biochem.* **4**, 530–539.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1969a) *Eur. J. Biochem.* **7**, 471–484.
Mitchell, P. & Moyle, J. (1969b). *Eur. J. Biochem.* **9**, 149–155.
Mitchell, P., Moyle, J. & Mitchell, R. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 627–640.
Moore, A. L. & Rich, P. R. (1980). *Trends Biochem. Sci.* **5**, 284–288.
Moyle, J. & Mitchell, P. (1973). *FEBS Lett.* **30**, 317–320.
Moyle, J. & Mitchell, P. (1978a). *FEBS Lett.* **90**, 361–365.
Moyle, J. & Mitchell, P. (1978b). *FEBS Lett.* **88**, 268–272.

Munn, E. A. (1974). "The Structure of Mitochondria". Academic Press, London & New York.
Nedergaard, J. & Cannon, B. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 3–28.
Nelson, N. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 314–338.
Neumann, J. & Jagendorf, A. T. (1964). *Arch. Biochem. Biophys.* **107**, 109–119.
Nicholls, D. G. (1974). *Eur. J. Biochem.* **50**, 305–315.
Nicholls, D. G. (1976). *Trends Biochem. Sci.* **1**, 128–130.
Nicholls, D. G. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 1–29.
Nicholls, D. G. & Bernson, V. S. M. (1977). *Eur. J. Biochem.* **75**, 601–612.
Nicholls, D. G. & Crompton, M. (1980). *FEBS Lett.* **111**, 261–268.
Okamotu, H., Sone, N., Hirata, H., Yoshida, M. & Kagawa, Y. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 6125–6131.
Ovchinnikov, Y. A. (1979). *FEBS Lett.* **94**, 321–336.
Palmer, J. M. (1979). *Biochem. Soc. Trans.* **7**, 246–252.
Palmieri, F. & Klingenberg, M. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 279–301.
Papa, S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 39–84.
Park, R. B. & Sane, P. V. (1971). *Annu. Rev. Plant Physiol.* **22**, 395–430.
Parson, W. W. & Cogdell, R. J. (1975). *Biochim. Biophys. Acta* **416**, 105–149.
Pedersen, P. L. (1975). *Bioenergetics* **6**, 243.
Penefsky, H. S. (1979). *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* **49**, 223–280.
Pressman, B. C. (1976). *Annu. Rev. Biochem.* **45**, 501–530.
Prince, R. C. & Dutton, P. L. (1978). *In* "The Photosynthetic Bacteria" (R. K. Clayton & W. R. Sistrom, ed.) pp. 439–453. Plenum, New York.
Puskin, J. S., Gunter, T. E., Gunter, K. K. & Russell, P. R. (1976). *Biochemistry* **13**, 4811–4817.
Racker, E. (1975). *Biochem. Soc. Trans.* **3**, 785–802.
Racker, E. (1976). *Trends Biochem. Sci.* **1**, 244–247.
Racker, E. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 699–711.
Racker, E. & Stoekenius, W. (1974). *J. Biol. Chem.* **249**, 662–663.
Ragan, C. I. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 249–290.
Ragan, C. I. & Heron, C. (1978). *Biochem. J.* **174**, 783–790.
Ramos, S., Schuldiner, S. & Kaback, H. R. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 680–688.
Reeves, S. G. & Hall, D. O. (1978). *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 275–297.
Reynafarje, B., Brand, M. D., Alexandre, A. & Lehninger, A. L. (1979). *Methods Enzymol.* **55**, 640–656.
Rieske, J. S. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* **145**, 179–193.
Rieske, J. S. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 195–247.
Rosing, J. & Slater, E. C. (1972). *Biochim. Biophys. Acta* **267**, 275–290.
Rottenberg, H. (1975). *Bioenergetics* **7**, 61–74.
Rottenberg, H. (1976). *FEBS Lett.* **66**, 159–163.
Rottenberg, H. (1979a). *Methods Enzymol.* **55**, 547–569.
Rottenberg, H. (1979b). *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 225–253.
Rydström, J. (1977). *Biochim. Biophys. Acta* **463**, 155–184.
Ryrie, I. J. & Jagendorf, A. T. (1972). *J. Biol. Chem.* **24**, 4453–4459.
Saris, N.-E., L. & Åkerman, K. E. O. (1980). *Curr. Topics Bioenergetics* **10**, 103–179.
Scarpa, A. (1979). *Methods Enzymol.* **56**, 301–338.
Scheurich, P., Schäfer, H.-J. & Dose, K. (1978). *Eur. J. Biochem.* **88**, 253–257.
Selwyn, M. J., Dawson, A. P. & Dunnett, S. J. (1970). *FEBS Lett.* **10**, 1–5.
Senior, A. E. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **301**, 249–277.
Shavit, N. (1980). *Annu. Rev. Biochem.* **49**, 111–138.

Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). *Science* **175**, 720–731.
Skulachev, V. P. (1970). *Biochim. Biophys. Acta* **216**, 30–42.
Skulachev, V. P. (1971). *Curr. Topics Bioenergetics* **4**, 127–190.
Skulachev, V. P. (1976). *FEBS Lett.* **64**, 23–25.
Skulachev, V. P. (1979). *Methods Enzymol.* 55, 586–603.
Slater, E. C. (1953). *Nature (London)* **172**, 975–976.
Slater, E. C. (1974). *Biochem. Soc. Trans.* **2**, 1149–1163.
Slater, E. C., Rosing, J. & Mol, A. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **292**, 534–553.
Sone, N., Yoshida, M., Hirata, H. & Kagawa, Y. (1977). *J. Biol. Chem.* **252**, 2956–2960.
Sorgato, M. C., Ferguson, S. J., Kell, D. B. & John, P. (1978). *Biochem. J.* **174**, 237–256.
Stoekenius, W. (1976). *Sci. Amer.* **234**, 38–46.
Stoekenius, W., Lozier, R. H. & Bogomolni, R. A. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 215–278.
Tedeschi, H. (1979). *Trends Biochem. Sci.* **4**, N182–N185.
Thayer, W. S. & Hinkle, P. C. (1973). *J. Biol. Chem.* **248**, 5395–5402.
Thayer, W. S. & Hinkle, P. C. (1975). *J. Biol. Chem.* **250**, 5330–5335.
Trebst, A. (1976). *Trends Biochem. Sci.* **1**, 60–62.
Unwin, P. N. T. & Henderson, R. (1978). *J. Mol. Biol.* **94**, 425–440.
Van Dam, K., Westerhoff, H. V., Krab, K., van der Meer, R. & Arents, J. C. (1980). *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 240–250.
Vignais, P. V. (1976). *Biochim. Biophys. Acta* **456**, 1–38.
Von Jagow, G., Schägger, H., Engel, W. D., Machleidt, W., Machleidt, I. & Kolb, H. J. (1978). *FEBS Lett.* **91**, 121–125.
Waggoner, A. S. (1976). *J. Mem. Biol.* **27**, 317–334.
Walz, D. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 279–354.
West, I. C. & Mitchell, P. (1972). *J. Bioenergetics* **3**, 445–462.
West, I. C. & Mitchell, P. (1973). *Biochem. J.* **132**, 587–592.
Westerhoff, H. V. & van Dam, K. (1979). *Curr. Topics Bioenergetics* **9**, 1–62.
Wikström, M. K. F. (1973). *Biochim. Biophys. Acta* **301**, 155–193.
Wikström, M. K. F. & Krab, K. (1978). *FEBS Lett.* **91**, 8–14.
Wikström, M. K. F. & Krab, K. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **549**, 177–222.
Wikström, M. K. F. & Krab, K. (1980). *Curr. Topics Bioenergetics* **10**, 51–101.
Wilbrandt, W. (1974). *In* "Biomembranes" (H. Eisenberg *et al.*, ed.) Vol. 7, 11–31. Plenum, New York.
Williams, R. J. P. (1961). *J. Theor. Biol.* **1**, 1–13.
Williams, R. J. P. (1976). *Trends Biochem. Sci.* **1**, N222–N224.
Williams, R. J. P. (1978a). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 1–44.
Williams, R. J. P. (1978b). *FEBS Lett.* **85**, 9–19.
Wilson, D. B. (1978). *Annu. Rev. Biochem.* **47**, 933–965.
Witt, H. T. (1979). *Biochim. Biophys. Acta* **505**, 355–427.
Wraight, C. A., Cogdell, R. J. & Chance, B. (1978). *In* "The Photosynthetic Bacteria" (R. K. Clayton & W. R. Sistrom, ed.) pp. 471–511. Plenum, New York.
Zalman, L. S., Nikaido, H. & Kagawa, Y. (1980). *J. Biol. Chem.* **255**, 1771–1774.
Zilberstein, D., Schuldiner, S. & Padan, E. (1979). *Biochemistry* **18**, 669–673.

中科院植物所图书馆
S0011805

致　谢

本书承中国科学院杨福愉教授校订。

林治焕

精心的

谨在此

58.17111
25708　166

生物力学

化学渗透理论介绍　1987

借者单位	借者姓名	借出日期	还书日期
	刘印	91.5.21	

58.17111
166

注　意

1 借书到期请即送还。
2 请勿在书上批改圈点，折角。
3 借去图书如有污损遗失等情形须照章赔偿。

25708

京卡 0 7 0 1

收到期 91.5.
来源 科学
书价 1.55
登记号 2641
入藏日期 91.5.

统一书号：13031·36
定　　价：1.55 元

本社书号：4921·13-10
科技新书目：147-029